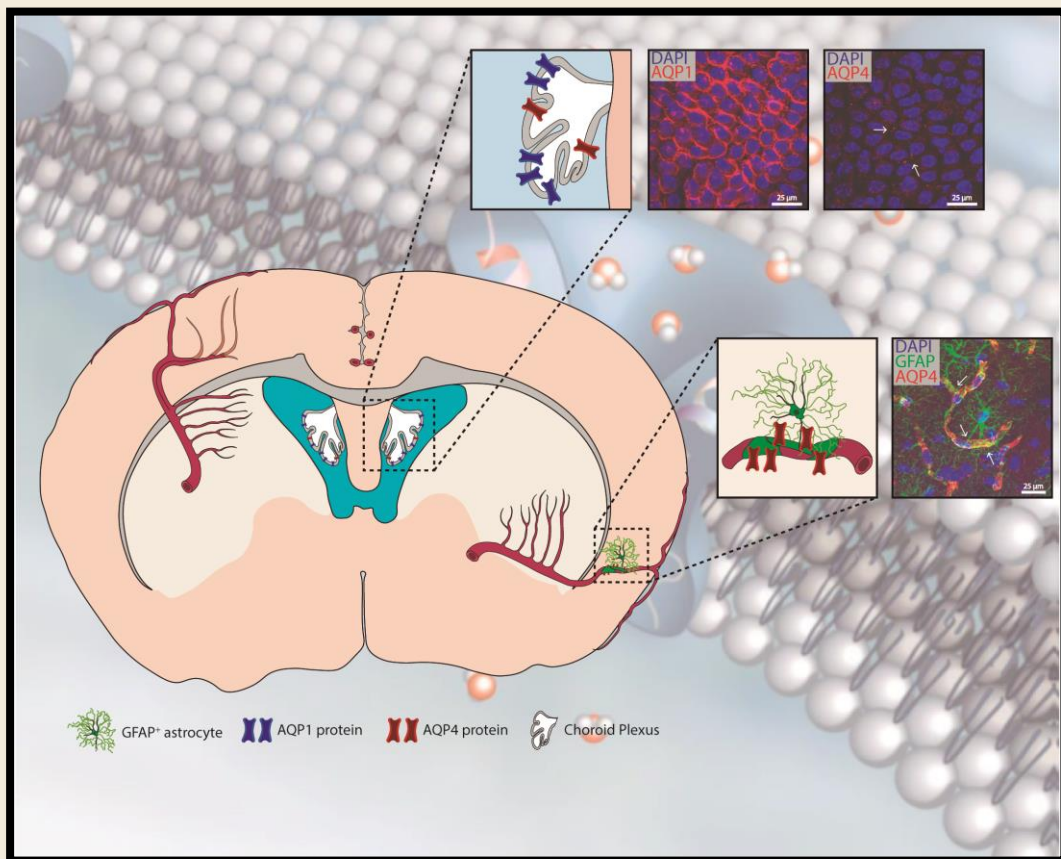




UNIVERSIDAD DE SEVILLA

# CONTRIBUCIÓN DE LAS ACUAPORINAS CEREBRALES A LA HOMEOSTASIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE LA HIDROCEFALIA ASOCIADA A HIPOXIA Y ENVEJECIMIENTO



TESIS DOCTORAL  
JOSÉ LUIS TRILLO CONTRERAS  
SEVILLA, 2020

**IBiS**  
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA





**Ilustración de cubierta:** Representación esquemática de una sección coronal de cerebro de ratón wt joven en la que se ilustran algunas de las vías principales de perfusión sanguínea. Las ampliaciones de los recuadros muestran la expresión de las principales acuaporinas del CNS, AQP1 y AQP4, en plexo coroideo y en los procesos de astrocitos perivasculares.





**Instituto de Biomedicina de Sevilla**

**Departamento de Fisiología Médica y Biofísica**

**Facultad de Medicina**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**CONTRIBUCIÓN DE LAS ACUAPORINAS CEREBRALES A LA  
HOMEOSTASIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y SU  
PAPEL EN EL DESARROLLO DE LA HIDROCEFALIA  
ASOCIADA A HIPOXIA Y ENVEJECIMIENTO**

José Luis Trillo Contreras

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por la  
Universidad de Sevilla

2020



# AGRADECIMIENTOS

No resulta sencillo expresar en unas pocas líneas el agradecimiento que siento por todas aquellas personas que me han acompañado en la aventura que ha supuesto embarcarse en este proyecto de tesis doctoral. A muchos me gustaría darles las gracias y recordar en persona las anécdotas y experiencias vividas en estos años, tanto en el laboratorio como ajeno al mismo, aunque hay algunos nombres que han sido muy importantes y a los que me gustaría agradecer especialmente:

A Miriam Echevarría, por haberme concedido la oportunidad de empezar a trabajar en el mundo de la ciencia en su grupo de investigación, por haberme acompañado y apoyado durante mi formación y desarrollo, y por transmitirme su ambición y confianza en el trabajo bien hecho, incluso “aunque no se entiendan los resultados”.

A Francisco Javier Villadiego, por la paciencia que ha tenido al instruirme en todas las técnicas que he aprendido y empleado en estos años, por inculcarme una metodología y conocimientos científicos de la forma más humana y cercana posible.

A Juan José Toledo, por enseñarme la importancia del rigor científico y haberme dado la oportunidad de conseguir financiación para poder realizar este proyecto.

Al resto de compañeros de laboratorio, con quienes he trabajado y compartido más tiempo en estos años, especialmente con Roberto García, tanto por los almuerzos y charlas de café como por las horas en el animalario operando y haciendo comportamiento.

A todos los servicios y compañeros del IBiS, puesto que, parte de esta tesis es gracias ellos, por su trabajo y dedicación.

A mis amigos del colegio, de la infancia, de la carrera, a quienes, por más años que transcurran, sigo teniendo en un vínculo cercano y son una parte importante de mí. A quienes, a pesar de no nombrar uno a uno, saben quiénes son y agradeceré personalmente, pues la ocasión lo merece.

Mi mayor "gracias" es para mi familia. Tanto para los que están como para los que van a llegar, o los que recientemente nos dejaron. En especial, a mis padres, José Luis Trillo y M<sup>a</sup> Dolores Contreras, pues siempre me han enseñado que el esfuerzo, trabajo y dedicación tienen su recompensa, por su apoyo en todo cuanto he hecho siempre, por enseñarme a ser feliz y sacar el lado positivo a todas las cosas y, sobre todo, porque gracias a ellos soy la persona que soy. No puedo olvidar dar las gracias a la familia de Ana Benítez, de los cuales me considero ya parte de ellos, pues desde el principio me han hecho sentir uno más. A Ana y Nura, pues son quienes más me han aguantado, y me han acompañado en los mejores y en los peores momentos de este largo camino. Gracias por ser mi fuente inagotable de energía.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE TABLAS .....	V
ABREVIATURAS .....	VI
INTRODUCCIÓN .....	1
1. INTRODUCCIÓN A LAS ACUAPORINAS .....	3
1.1. <i>Acuaporinas: canales de agua celulares</i> .....	3
1.2. <i>Clasificación de las acuaporinas</i> .....	4
1.3. <i>Estructura de las acuaporinas</i> .....	6
1.4. <i>Función biológica y localización de las acuaporinas</i> .....	10
1.5. <i>Regulación de la expresión de las acuaporinas</i> .....	18
2. EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y SU HOMEOSTASIS .....	22
2.1. <i>Hipótesis clásica de la circulación del líquido cefalorraquídeo</i> .....	22
2.2. <i>Nueva concepción en la homeostasis del líquido cefalorraquídeo</i> .....	28

<b>3. PAPEL DE LAS ACUAPORINAS ASOCIADO A PATOLOGÍAS DE LOS FLUIDOS</b>	
<b>CEREBRALES .....</b>	<b>33</b>
<i>Edema.....</i>	33
<i>Hidrocefalia .....</i>	35
<i>Otras patologías neurológicas .....</i>	38
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>1. PAPEL DE AQP1 Y AQP4 EN LA HOMEOSTASIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO .....</b>	<b>47</b>
1.1. <i>Resumen de los resultados .....</i>	47
1.2. <i>Trillo-Contreras, J.L. et al. AQP1 and AQP4 Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis. Cells 2019, 8(2), 197. ....</i>	49
<b>2. EFECTOS DE LA HIPOXIA Y LA EDAD EN LA HOMEOSTASIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO: DESARROLLO DE UN MODELO DE MURINO DE HIDROCEFALIA CRÓNICA DEL ADULTO .....</b>	<b>64</b>
2.1. <i>Resumen de los resultados .....</i>	64
2.2. <i>Trillo-Contreras, J.L. et al. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. BBA – Molecular Basis of Disease 2018, 1864(10), 3515-3526.....</i>	66
<b>3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES FISIOLÓGICAS TRAS LA ELIMINACIÓN DEL ESTÍMULO HIPÓXICO .....</b>	<b>83</b>
3.1. <i>La renormoxia reestablece los valores de producción del líquido cefalorraquídeo y revierte el deterioro cognitivo en ratones envejecidos.....</i>	83
3.2. <i>La hipoxia produce una disminución permanente de la capacidad de drenaje del líquido cefalorraquídeo y de la distensibilidad ventricular en ratones envejecidos.....</i>	87

3.3. <i>Episodios sucesivos de hipoxia producen ventriculomegalia crónica.</i> .....	89
<b>DISCUSIÓN</b> .....	91
<b>CONCLUSIONES</b> .....	103
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	5
Figura 2.....	8
Figura 3.....	12
Figura 4.....	13
Figura 6.....	24
Figura 7.....	27
Figura 8.....	28
Figura 9.....	30
Figura 10.....	84
Figura 11.....	85
Figura 12.....	86
Figura 13.....	88
Figura 14.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	11
Tabla 2.....	16

## ABREVIATURAS

**AD:** *“Alzheimer Disease”*

**AQP:** *“Aquaporin”*

**BBB:** *“Blood-Brain Barrier”*

**CNS:** *“Central Nervous System”*

**CP:** *“Choroid Plexus”*

**CSF:** *“Cerebrospinal Fluid”*

**<sub>a</sub>CSF:** *“artificial CSF”*

**ECS:** *“Extracelular Space”*

**GFAP:** *“Glial Fibrillary Acidic Protein”*

**HIF:** *“Hypoxia-Inducible Factor”*

**Hx:** *“Hypoxia”*

**ISF:** *“Interstitial Fluid”*

**IVP:** *“Intraventricular Pressure”*

**KO:** *“Knock-Out”*

**MIP:** *“Major Intrinsic Protein”*

**MRI:** *“Magnetic Resonance Imaging”*

**iNPH:** *“idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus”*

**Nx:** *“Normoxia”*

**OAP:** *“Orthogonal Arrays of Particles”*

**ReNx:** *“Renormoxia”*

**RNA:** *“Ribonucleic Acid”*

**mRNA:** *“messenger RNA”*

**iRNA:** *“interference RNA”*

**S.E.M.:** *“Standard Error of the Mean”*

**SAS:** *“Subarachnoid Space”*

**VRS:** *“Virchow-Robin Space”*

**wt:** *“wild type”*

# **INTRODUCCIÓN**

---





# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN A LAS ACUAPORINAS

### 1.1. *Acuaporinas: canales de agua celulares*

El agua es el compuesto mayoritario de todos los organismos vivos y es esencial para la vida. En él se encuentran disueltos todos los iones y macromoléculas orgánicas que forman parte de las células e interviene en la mayoría de los procesos biológicos, como la homeostasis y el equilibrio osmótico de las células. Una adecuada permeabilidad de las membranas biológicas al agua resulta fundamental para permitir que los compartimentos intra- y extracelulares mantengan su isotonicidad, por existir una distribución desigual de iones y otras moléculas a uno y otro lado de la membrana, lo que conlleva una entrada y salida de agua que genera cambios en el volumen celular. Los mecanismos por los cuales es posible este hecho han sido siempre motivo de controversia [1] y ha suscitado una de las cuestiones de mayor interés en la biología: ¿cómo se mueve el agua a través de las membranas celulares?

El agua puede atravesar la membrana por difusión simple a través de la bicapa lipídica o mediante difusión facilitada a través de poros acuosos. Aunque por muchos años se asumió que el movimiento del agua sólo ocurría por medio del primer mecanismo debido a su carga total neutra y a su reducido tamaño, la baja solubilidad del agua en la fase lipídica de la membrana, la elevada energía de activación que este proceso requería y la alta permeabilidad al agua encontrada en algunas células, como glóbulos rojos y células epiteliales del túbulo proximal renal, donde el flujo de agua a través de la membrana era superior al esperado por

difusión simple, obligaba a pensar en la existencia de vías preferenciales para el paso de esta molécula a través de la membrana plasmática [2]. Por otro lado, la existencia de ciertas membranas con muy baja permeabilidad al agua, como en las células renales del segmento ascendente del asa de Henle, ponía en evidencia que la permeabilidad al agua no es una propiedad constitutiva de la bicapa lipídica, sino que dependía de un factor proteico, cuya expresión y función podía variar en los distintos tipos celulares. Todos estos hallazgos, sumados al descubrimiento de que el movimiento de agua a través de las membranas de los glóbulos rojos podía bloquearse mediante el uso de derivados de compuestos mercuriales [3], sugerían la existencia de proteínas especializadas en la formación de poros acuosos en la membrana plasmática.

A principios de la década de los noventa, Gregory Preston y Peter Agre tratando de aislar la proteína de la membrana de los eritrocitos responsable del factor Rh, hallaron un polipéptido de 28 kDa que copurificaba con su proteína de interés y pensaron que se trataba de un subproducto de la misma. El análisis estructural reveló que se trataba de una nueva proteína integral de membrana sin relación alguna con la proteína Rh, la cual fue denominada CHIP-28 (del inglés *channel-forming integral protein*), y que recibiría más tarde el nombre de acuaporina 1 (AQP1) [4]. Poco después, en trabajos realizados en ovocitos de la rana *Xenopus laevis*, se demostró la función de esta proteína como facilitador del flujo de agua a través de la membrana plasmática. En estos estudios, la expresión heteróloga de AQP1 producía un aumento en la permeabilidad de las células, en comparación con ovocitos control que no expresaban dicha proteína [5]. Se pudo establecer así, la identidad del primer canal de agua, y su identificación molecular dirigió la atención de un amplio grupo de investigadores al descubrimiento de las trece acuaporinas que hoy se conocen en humanos [6-9].

### **1.2. Clasificación de las acuaporinas**

Desde que en 1992 se definiera por primera vez a AQP1 como un genuino canal de agua de los glóbulos rojos de humanos, más de 450 variedades distintas de acuaporinas han sido identificadas hasta la fecha, estando presentes en todos los reinos de la naturaleza: desde organismos unicelulares como arqueas, bacterias o levaduras, que cuentan con algunos genes que codifican para acuaporinas, hasta organismos pluricelulares como hongos, plantas y animales, con múltiples genes que expresan distintas acuaporinas, demostrando el papel básico de estas proteínas en el mantenimiento de las funciones fisiológicas de todos los organismos [10].



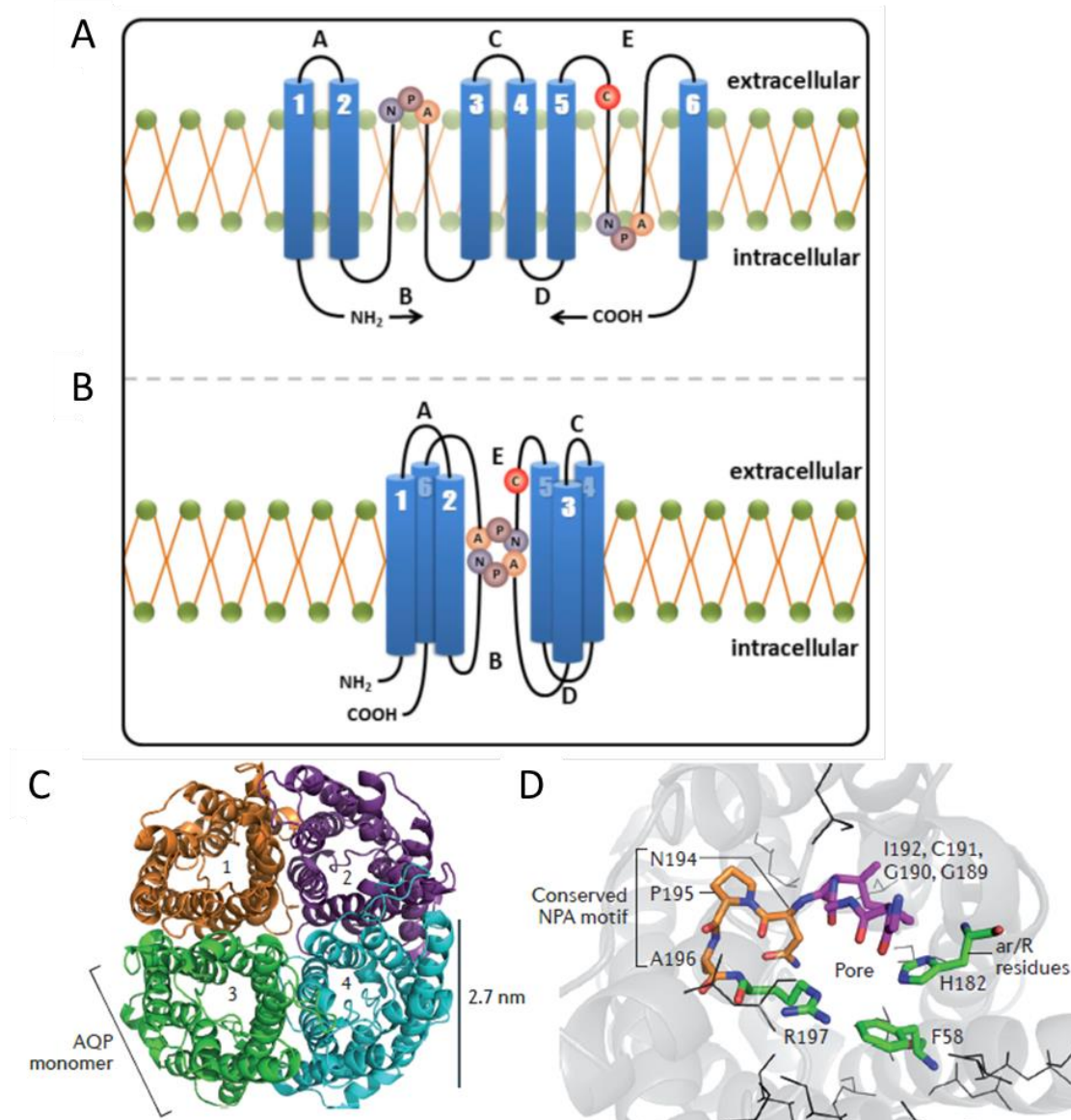
Antes de que se identificara AQP1, en 1984 se encontró una proteína presente en las células fibrosas del cristalino y, pese a que su función no estaba clara, por su estructura se pensó que se trataría de una proteína de unión estrecha, por lo que se la asoció con la gran familia de las proteínas integrales de membrana y se la denominó MIP (*major intrinsic protein*) [12]. Después de que se descubriera la función de AQP1, la similitud estructural de esta con MIP indujo a pensar que se tratara de otro canal de agua, por lo que fue renombrada como AQP0 [13]. Desde entonces, se han identificado en mamíferos hasta 13 acuaporinas distintas que han sido clonadas y caracterizadas en base a su homología con la secuencia de la familia MIP (**Figura 1**). Se denominan acuaporinas “estrictas” al grupo constituido por AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8 debido a su mayor homología y a su funcionamiento como canales de agua canónicos. AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10 pertenecen al grupo de las acuagliceroporinas ya que ofrecen permeabilidad al glicerol, urea y algunos pequeños solutos de carga neutra, además de al agua [11]. Aunque las acuaporinas de este grupo presenten una homología superior al 40% en su secuencia aminoacídica, se encuentran más próximas a la proteína GlpF (del inglés *glycerol uptake facilitator protein*) de *Escherichia coli* que al grupo de las “estrictas”. Es de destacar el grupo conformado por las “superacuaporinas”, descubierto más recientemente y constituido por AQP11 y AQP12. Son las que más distan en su secuencia aminoacídica del resto de la familia MIP, con aproximadamente un 25% de homología [14-16]. Están descritas como permeables al agua, aunque AQP11 permite, además, el paso de moléculas de glicerol y peróxido de hidrógeno.

### 1.3. Estructura de las acuaporinas

Las acuaporinas son pequeñas proteínas ( $\approx 30$  kDa) cuyo tamaño oscila entre los 255 y 342 aminoácidos, y constan de seis  $\alpha$ -hélices (conocidas como M1, M2, M4 - M6 y M8) y dos medias hélices (M3 y M7), unidos por cinco lazos conectores (lazos A – E). Los dominios amino y carboxilo terminales se encuentran situados en la cara intracelular. Dos de los lazos, uno extracelular y otro intracelular, se pliegan hacia la membrana para formar un poro central de naturaleza anfipática. Este plegamiento resulta en una estructura en forma de reloj de arena que delimita una zona central estrecha que se ensancha abriéndose hacia ambos lados de la membrana. Hay dos motivos consenso de Asn-Pro-Ala (tripletes NPA) conservados en las medias hélices M3 y M7 que constituyen la zona central, y cuyas cadenas laterales de asparragina se orientan hacia el interior del poro y forma uno de los sitios más estrechos del canal, de menos de 3 Å de diámetro para las acuaporinas “estrictas” (la molécula de agua tiene

2,8 Å), o de 3,4 Å para las acuagliceroporinas, coincidiendo con el diámetro de la molécula de glicerol. Estos residuos forman la parte hidrófila del poro y son los responsables de la generación de dipolos eléctricos mediante puentes de hidrógeno en los motivos NPA para coordinar el transporte de agua (y/o glicerol para las acuagliceroporinas) a través del canal [17,18]. La estructura generada por los dos lazos a través de los tripletes NPA se estabiliza y se mantiene mediante fuerzas de Van der Waals entre los residuos de prolina (**Figura 2**).

La permeabilidad de las acuaporinas al agua es muy alta: se estima que hasta  $3 \times 10^9$  moléculas de agua pueden pasar a través de cada monómero por segundo [19,20]. Desde que fueron descubiertas, llamó la atención no sólo la gran capacidad de transporte de agua, sino también su alta selectividad, impidiendo el paso de solutos o iones, e incluso de protones. Conocer la estructura molecular de AQP1 ayudó a explicar que la selectividad de estas proteínas al movimiento de agua se debe a la restricción que ejercen los residuos aromáticos y de arginina (ar/R) que componen la superficie hidrofóbica del poro. El impedimento físico que ejercen los aminoácidos aromáticos evita que solutos de mayor tamaño pasen a través del poro, mientras que los aminoácidos dotados de carga eléctrica orientan sus polos positivos hacia el centro del poro, generando una importante fuerza electrostática positiva que repele protones y otros cationes, permitiendo sólo el paso de solutos neutros. Existe una segunda barrera al paso de protones que se debe al fuerte dipolo que generan los dos tripletes NPA en el centro del poro. Los residuos de asparragina de estos motivos reorientan las moléculas de agua, con los átomos de hidrógeno perpendiculares al eje de poro. El campo electrostático que se genera hace que las moléculas de agua en la mitad superior e inferior del canal estén orientadas en sentidos opuestos, impidiendo la transferencia de protones entre una y otra, en lo que se conoce como mecanismo de Grotthuss o “salto” de protones [21]. Además, en solución, los protones se encuentran hidratados en forma de iones hidronio ( $H_3O^+$ ), lo cual aumenta su tamaño. La estrechez del poro y la hidrofobicidad de la superficie interna del canal hacen que la desolvatación de esta agua protonada no sea favorable energéticamente. Todo ello explica la alta permeabilidad al agua de las acuaporinas y su elevada selectividad [22].



**Figura 2 XE "" . Representación esquemática de la estructura general de las acuaporinas a partir de su secuencia primaria y su plegamiento en la membrana plasmática. (A) Se muestran las 6  $\alpha$ -hélice de las que consta la proteína (M1, M2, M3, M4, M5, M6), orientándose cada una 180° respecto a otra, atravesando la membrana plasmática en tándem, unidos por 5 lazos conectores (A, B, C, D, E). (B) Los motivos consenso de asparragina-prolina-alanina (tripletes NPA) forman parte de 2 medias hélices que se pliegan entre sí para dar lugar al poro central y la parte estrecha de la proteína ( $\approx 3 \text{ \AA}$  de diámetro), mostrando una conformación en forma de reloj de arena. En el lazo E se localiza la cisteína (C, en rojo) responsable de la impermeabilidad del poro por cambio conformacional cuando se une a compuestos mercuriales. Modificado de Sales et al., 2013. [23]. (C) Vista superior de la cara extracelular de un homotetrámero de AQP1, con los poros de cada monómero etiquetados del 1 – 4. El modelo obtenido procede de la resolución de imágenes de rayos X para cristales de AQP1 bovina. (D) Vista del poro central de AQP1 por la cara extracelular. Los residuos de Asn-Pro-Ala (Asn194, Pro195, Ala196) son la región consenso de la media hélice M7, y se muestran en color naranja. Estos son los responsables, junto con las cadenas laterales de los residuos de glicina, cisteína e isoleucina (Gly189, Gly190, Cys191, Ile192), representados en morado, de la superficie hidrófila del poro y de facilitar el movimiento de agua a través del canal, mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Los residuos aromáticos y de arginina (ar/R) impiden el paso de solutos de mayor tamaño y de protones, pues suponen la parte hidrófoba del poro (en verde). Modificado de Verkman et al., 2014. [18]**

Cada uno de estos monómeros de acuaporina constituye por sí mismo un poro independiente, pero mediante cristalografía electrónica y de rayos X se ha podido saber que estos se ensamblan formando una estructura homotetramérica en la membrana [24]. Los cuatro monómeros forman un poro central cuya función no está claramente establecida. En relación a la permeabilidad del poro central algunos estudios de simulaciones dinámicas *in silico* han sugerido que se trate de un canal que permanece cerrado y, en respuesta a cambios conformacionales, se produzca la activación y apertura del mismo. En este sentido se ha sugerido que la fosforilación de residuos clave en la estructura o cambios de pH, en AQP1 y AQP5, permiten la permeabilidad de moléculas de gas como CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> ó NO por el poro central [25]. También se ha propuesto para AQP1 que dicho poro central se trate de un canal iónico activado en respuesta a una elevación de los niveles de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) en la célula. No obstante, la función biofísica de este poro central sigue sin estar suficientemente esclarecida. [26]

Una característica interesante de AQP4 es que es la única acuaporina conocida hasta el momento que puede organizarse en un nivel de ordenamiento superior. Los tetrámeros se ensamblan en estructuras mayores llamadas OAP (del inglés *orthogonal arrays of particles*) [27], que se estabilizan por interacción entre los residuos amino-terminales de los monómeros de AQP4. Además, esta es también la única acuaporina en la que existen dos isoformas conocidas, debido a la existencia de dos sitios de inicio de traducción diferentes, en la metionina Met1 (AQP4-M1) o en la Met23 (AQP4-M23) [28]. Estos 22 aminoácidos de diferencia son suficientemente importantes como para permitir la formación de estructuras o matrices ortogonales con la isoforma AQP4-M23, pero no con la AQP4-M1. Esta última tiene un extremo N-terminal más largo y voluminoso que, por impedimento estérico, dificulta la estabilización de la estructura cristalina, aunque, hasta la fecha no se ha encontrado que se altere la permeabilidad al agua de las membranas biológicas entre ambas conformaciones [29]. Se ha sugerido, también, que diferencias en la relación M1-M23 pueden llevar a cambios en la migración y adhesión celular en astrocitos [28]. Sólo se han encontrado diferencias en la función biológica entre ambas isoformas en la enfermedad de la neuromielitis óptica (NMO, del inglés *neuromyelitis optica*). La NMO es una enfermedad autoinmune, y se ha descubierto recientemente la presencia de autoanticuerpos AQP4-inmunoglobulina G como marcador efectivo para el diagnóstico preciso de la enfermedad, y que tienen por objetivo los astrocitos del nervio óptico y de la médula espinal [30]. Más concretamente, es la isoforma AQP4-M23 la que activa el sistema inmune y la que muestra mayor reactividad frente a los autoanticuerpos de la NMO, y no la AQP4-M1 [31].

#### 1.4. Función biológica y localización de las acuaporinas

Las acuaporinas están ampliamente representadas en el cuerpo, y tradicionalmente se las han definido como facilitadores del transporte pasivo de agua a través de la membrana plasmática de las células. Respecto a esta función, está bien establecido que se expresan de forma abundante en epitelios y endotelios implicados en el transporte de fluidos, como en los túbulos renales, epitelios glandulares y plexos coroideos (CP). No obstante, también se ha descrito su expresión en otros tejidos en los que su función no se ha relacionado de forma tan directa con el movimiento de líquidos, como en las células de la piel y en los adipocitos.

Para dilucidar la función fisiológica de la mayoría de estas proteínas, estudios fenotípicos realizados en ratones “*Knock-out*” (KO) han contribuido de forma importante a salvar la limitación que ha supuesto la falta de inhibidores específicos para todos los miembros de la familia de las acuaporinas. Así, además de su función como canal de agua y otras moléculas de pequeño tamaño, como glicerol, se ha propuesto su participación en otros procesos como señalización celular, migración celular, angiogénesis, metástasis tumoral y cicatrización de heridas. Del mismo modo, se ha atribuido una amplia gama de trastornos clínicos a la pérdida o disfunción de las acuaporinas, incluidas anomalías en función renal, pérdida de visión y la aparición de edema cerebral. Por ejemplo, ante una modificación en la estructura de las acuagliceroporinas, o en ausencia de estas, se desarrollan fenotipos muy variados, entre los que se incluyen, piel seca, resistencia a la carcinogénesis de la piel, proliferación celular alterada y disfunción en el metabolismo de las grasas [32].

Por lo general, la expresión de las distintas acuaporinas no se restringe a un solo órgano o tejido, pero su presencia en un tipo celular específico está, a menudo, estrechamente relacionada con su función fisiológica [33]. La **tabla 1** describe la localización y papel biológico de las acuaporinas expresadas en el ser humano, así como algunas patologías asociadas por disfunción de las mismas.

Además de la tradicional función de las acuaporinas como canales de agua, y glicerol para las acuagliceroporinas, se ha descrito la capacidad de algunas de estas proteínas en facilitar el transporte de gases, como CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub> y NO [34,35] e incluso O<sub>2</sub> [36]. Igualmente, se han encontrado evidencias de algunas acuaporinas implicadas en el movimiento de aniones como NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o Cl<sup>-</sup>, así como moléculas polares de mayor tamaño como algunos azúcares y peróxido de hidrógeno[37,38].



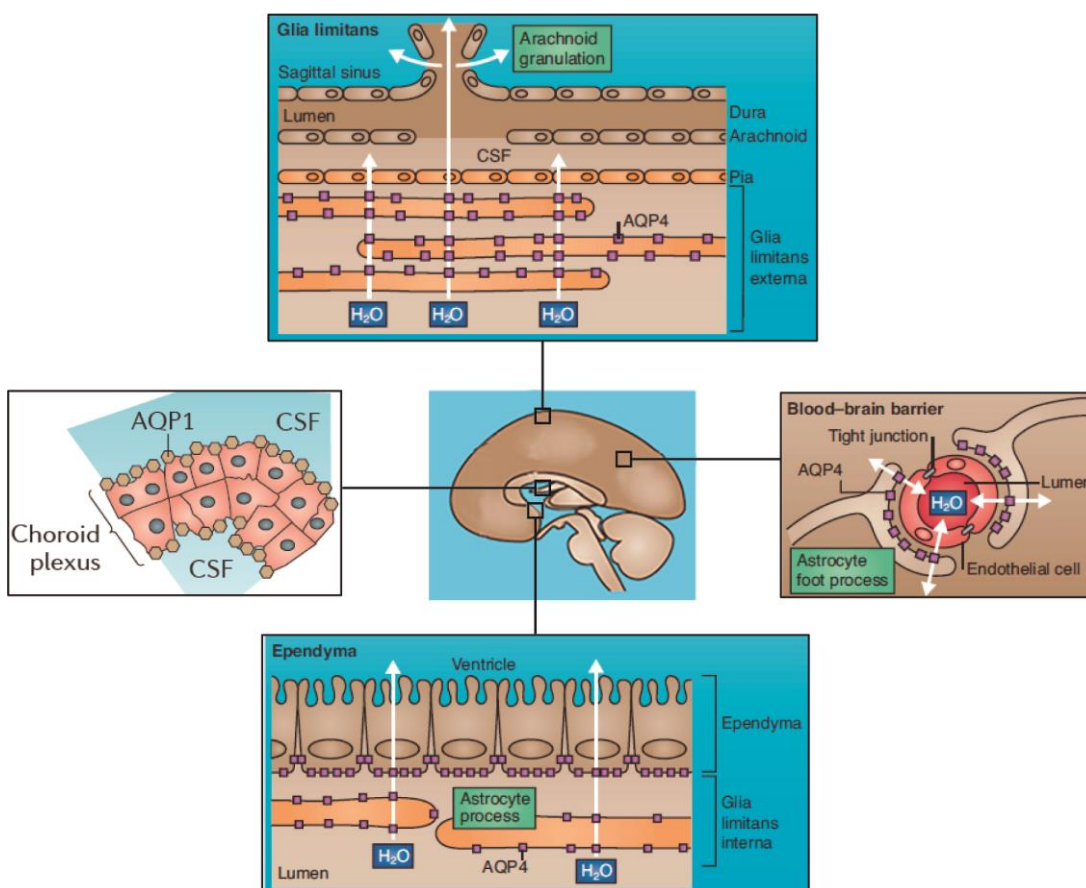
Proteína	UniProt ID	Expresión en tejidos	Enfermedades asociadas	Funciones conocidas	Referencias
AQP0	P30301	Células fibrosas del cristalino	Cataratas congénitas	Adhesión celular	Verkman et al., 2002 [39]
AQP1	P29972	Eritrocitos, plexos coroideos, riñón, corazón, pulmón, endotelio vascular, piel, testículos, ovarios y útero	Edema pulmonar, edema cerebral, edema periférico, glaucoma	Concentración urinaria	Ma et al., 1998 [40]
AQP2	P41181	Túbulo colector renal	Diabetes insípida nefrogénica	Reabsorción de agua dependiente de hormona antidiurética	Deen et al., 1994 [41]
AQP3	Q92482	Riñón, leucocitos, eritrocitos, piel, ojos, vías respiratorias, tracto gastrointestinal, ovarios	No identificada	Sudoración y elasticidad de la piel	Echevarría et al., 1994; Nielsen et al., 1997; Nagelhus et al., 1998; [7, 42, 43]
AQP4	P55087	Cerebro, retina, glándulas salivares y lacrimales, epitelio olfatorio y auditivo, tracto gastrointestinal, riñón, pulmón y músculo esquelético	Edema cerebral, sordera, anosmia	Control del equilibrio hídrico cerebral	Manley et al., 2000; Jarius et al., 2010 [30, 44]
AQP5	P55064	Epitelios de glándulas lacrimales, sudoríparas y salivares, mucosa alveolar, bronquial y traqueal, y piel	Asma bronquial, bronquitis crónica, síndrome de Sjögren, queratodermia palmoplantar	Absorción y secreción de agua en mucosas pulmonares y salivares	Tsubota et al., 2001 [45]
AQP6	Q13520	Vesículas intracelulares del túbulo colector renal	No identificada	No identificada	Yasui et al., 1999 [46]
AQP7	O14520	Tejido adiposo, testículos, riñón, corazón, músculo esquelético y ovarios	Hiperglicerolemia, defecto plaquetario, obesidad	Metabolismo lipídico desde adipocitos	Skowronki et al., 2007 [47]
AQP8	O94778	Hígado, páncreas, tracto gastrointestinal, glándulas salivares, riñón, pulmón y tráquea	No identificada	Formación de la bilis	Huebert et al., 2002; Saparov et al., 2007 [48, 49]
AQP9	O43315	Hígado, leucocitos, eritrocitos, testículos, ovarios, cerebro, riñón	Hiperglicerolemia	Metabolismo hepático de lípidos	Amiry-Moghaddam et al., 2005 [50]
AQP10	Q96PS8	Intestino delgado, específicamente en duodeno y yeyuno	No identificada	No identificada	Ishibashi et al., 2002 [51]
AQP11	Q8NBQ7	Riñón, hígado, testículos	No identificada	No identificada	Ishibashi et al., 2002 [51]
AQP12	Q8IXF9	Células acinares del páncreas	No identificada	No identificada	Ishibashi et al., 2002 [51]

**Tabla 1. Distribución de las acuaporinas en el ser humano y enfermedades asociadas a la disfunción o ausencia de las mismas.** Modificado de Verkman et al., 2014. [18]

De las 13 acuaporinas conocidas e identificadas en mamíferos, las principales y que más ampliamente se expresan en el sistema nervioso central (CNS) son AQP1 y AQP4 y, en menor medida, AQP9 y AQP11 (**Figura 3**). Mientras que AQP1 y AQP4 son canales específicamente permeables al agua y se las relaciona directamente a la homeostasis del líquido cefalorraquídeo (CSF), se ha sugerido que la acuagliceroporina AQP9 puede tener un papel en el metabolismo energético cerebral, al ser una proteína permeable al agua y a pequeños solutos, como el glicerol. El papel de AQP11, cuya expresión en CNS ha sido recientemente hallada [52], no se ha identificado por el momento.

Recientemente se ha podido describir mediante el uso de la tecnología de secuenciación del RNA de células individuales (en inglés *single-cell RNA sequencing*) la “arquitectura molecular”, así como la expresión génica de los diversos tipos celulares del CNS de ratón. En dicho estudio se llevó a cabo el análisis del transcriptoma de más de medio millón de células del sistema nervioso de ratón, relacionándose con los 265 clústeres celulares identificados donde se expresan. La clasificación taxonómica de cada uno de estos clústeres se

hizo en base a tres aspectos: la clase o tipo de célula (por ejemplo, neuronas, astrocitos...), la región donde se localiza (por ejemplo, telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo...) y el tipo de neurotransmisor (por ejemplo, dopamina, GABA, Glutamato...). Por último, el patrón de expresión génica para cada clúster celular se obtiene en base a un cálculo de frecuencia de expresión de dicho gen en cada célula de un clúster celular respecto de la expresión en todas las células de todos los clústeres.

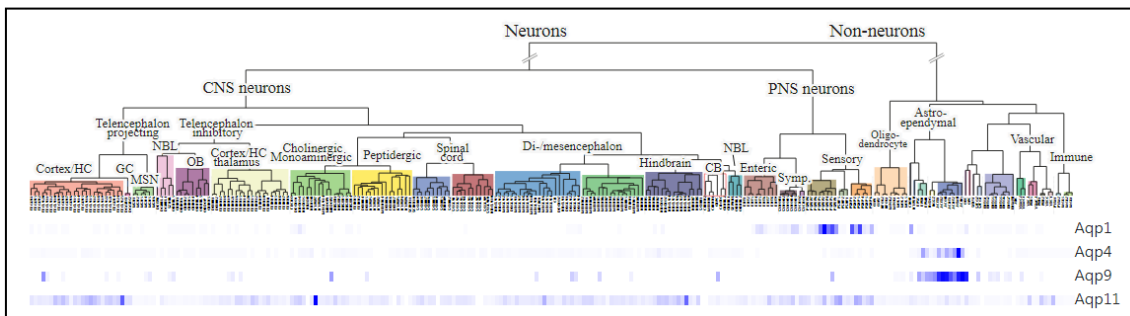


**Figura 3 XE ""** . Dibujo esquemático en el que se representa la distribución de AQP1 y AQP4 en el cerebro. AQP1 se expresa principalmente en la superficie apical del epitelio coroidal. AQP4 está presente en células del linaje astroependimario. Los mayores niveles de esta proteína se localizan en las células ependimarias que recubren los ventrículos y en los pies de los astrocitos que tapizan los capilares sanguíneos y el SAS, constituyendo un componente importante de la interfase sangre-cerebro-CSF. Modificado de Verkman, 2011. [53]

En esta tesis se han analizado los datos de expresión por *single-cell RNA sequencing* de las cuatro acuaporinas que se expresan en CNS (AQP1, AQP4, AQP9 y AQP11) en cada uno de los distintos clústeres celulares identificados en dicho estudio (**Figura 4**).

Está bien documentada la expresión de AQP1 en las células del endotelio vascular de todo el cuerpo, pero no en las cerebrales, y es especialmente abundante en eritrocitos, riñón y pulmones. En CNS, en particular, AQP1 se localiza exclusivamente en la membrana plasmática de las células epiteliales del CP en cerebros de primates y roedores, por lo que la producción coroidal de CSF está mediada por esta proteína. Como se puede ver en la **Tabla 2**, los datos analizados por *single-cell RNA sequencing* validan la alta expresión de *Aqp1* en el clúster celular #224, correspondiente a las células epiteliales del CP (#224 – *Choroid Plexus epithelial cells*: 1,93).

Además de en plexo, algunos trabajos han identificado la presencia de AQP1 en el asta dorsal de la médula espinal y el ganglio sensorial del nervio trigémino, relacionándose con la nocicepción [54]. En efecto, el análisis por *single-cell RNA sequencing* muestra una abundante expresión de *Aqp1* en los clústeres celulares #200 – 214, representativo de los ganglios de la raíz dorsal de la médula espinal. Además, los datos respaldaron la presencia de *Aqp1* en la vía aferente del quinto par craneal, del nervio trigémino (#69 – *Afferent nuclei of cranial nerves III-V*: 0,39), así como en ganglios de neuronas motoras (#194 – 195).



**Figura 4 XE ""** . Estudio molecular del sistema nervioso de ratón mediante el uso de la tecnología de *single-cell RNA sequencing*. Se representan y clasifican en un diagrama de árbol los 265 clústeres celulares distintos identificados basados en el análisis de 160,796 transcriptomas del sistema nervioso de ratón, procedente de cerebro, médula espinal, ganglios dorsales y simpáticos periféricos, y sistema nervioso entérico. El dendrograma representado se ha realizado empleando el recurso digital <http://mousebrain.org> elaborado en el laboratorio de Sten Linnarsson, obtenido de Zeisel et al. 2018 [56], y muestra la relación existente entre los tipos celulares y la expresión génica de *Aqp1*, *Aqp4*, *Aqp9* y *Aqp11*. Las bandas con gradación de color en la parte inferior de la figura muestran el patrón de expresión de cada gen en los 265 tipos celulares identificados. Cada banda representa la expresión relativa de dicho transcrito en un tipo celular respecto de la expresión máxima detectada de ese mismo transcrito en cualquier tipo celular. Al ser datos relativos, no se puede comparar la riqueza de expresión de los distintos transcritos entre sí, pero sí permite localizar dónde se expresan. Así, *Aqp4* y *Aqp9* parecen mostrar un patrón de expresión muy similar, predominando claramente en la línea astro-ependimaria, aunque sus niveles de expresión sean muy distintos. La expresión de *Aqp1* está bien definida en los ganglios dorsales y células endependimarias del CP, y contrasta con la alta deslocalización de *Aqp11*. Los datos absolutos de expresión se representan en la **Tabla 2**.

Por otro lado, existen diferencias en la distribución de AQP1 entre especies al observarse su expresión en una subpoblación de astrocitos en primates no humanos, pero no en roedores [55]. Esto sugiere que AQP1 puede tener un papel adicional en la homeostasis del CSF en primates no humanos respecto a roedores.

AQP4 es la acuaporina más abundante en el CNS. Se localiza principalmente en las prolongaciones de los astrocitos subpiales que forman la membrana glial limitante en la corteza, por debajo del espacio subaracnoideo (SAS) por el que fluye el CSF, y en los pies de astrocitos perivasculares que rodean los vasos sanguíneos que forman la barrera hematoencefálica (BBB) [42,43]. Esta distribución de AQP4, predominantemente en la línea astro-ependimaria, se ha podido corroborar con los datos de expresión por *single-cell RNA sequencing*, y al igual que con AQP1, se reflejan en la **Tabla 2**. Como se puede ver en dicha tabla, *Aqp4* presenta un patrón de expresión muy marcado en las células endimarias (#227 – *Ependymal cells*: 3,61; #228 – *Ependymal cells, midbrain*: 1,29) y en las células astrogiales (#230 – 236).

Las células endimarias, o endimocitos, son un tipo de célula glial. Tienen forma cilíndrica, ligeramente cuboidales, y poseen cilios que facilitan el flujo del CSF, por lo que están involucrados en su homeostasis. Revisten el sistema ventricular cerebral y el canal central de la médula espinal, por lo que constituyen una barrera o epitelio endimario, también llamado epéndima, que forma la interfase entre el parénquima cerebral y el espacio ventricular. Las células gliales se encargan de la regulación y la homeostasis del CNS y, según la región del cerebro, pueden llegar a ser hasta 10 veces más abundantes que las propias neuronas. Los astrocitos son las células gliales más abundantes del cerebro [57].

Resulta interesante reseñar de los datos reflejados de *Aqp4* en la línea astro-ependimaria de la **Tabla 2**, que hay diferencias importantes en los niveles de expresión entre los distintos astrocitos. Por ejemplo, hay una abundancia relativa en la expresión de *Aqp4* en astrocitos fibrosos en corteza cerebral respecto de astrocitos protoplásmicos (#231 – *Telencephalon astrocytes, fibrous*: 2,94; #232 – *Telencephalon astrocytes, protoplasmic*: 1,09). Esta misma expresión diferencial se puede observar en regiones no telencefálicas, como tálamo, bulbo raquídeo o médula espinal (#235 – *Non-telencephalon astrocytes, fibrous*: 3,80; #234 – *Non-telencephalon astrocytes, protoplasmic*: 2,10). Podemos advertir que, igualmente, existen notables diferencias entre otras células gliales, como en la zona subventricular, el bulbo olfatorio y en la glía de Bergmann (#230 – *Subventricular zone glia cells*: 0,43; #233 –

*Olfactory astrocytes*: 3,25; #237 – *Bergmann glia*: 2,49), aunque todavía no se conocen los efectos funcionales.

La distribución altamente polarizada de AQP4 en el cerebro, en el extremo de los astrocitos que envuelven los vasos sanguíneos que suponen la interfase entre sangre-cerebro-CSF, puede deberse a interacciones que se establecen entre este canal y proteínas intracelulares, como  $\alpha$ -sintrofina, y extracelulares, como el proteoglicano agrina, de expresión también en los podocitos de los astrocitos [58]. La ausencia de estas interacciones supone la pérdida de esta polarización.

Se ha mencionado anteriormente que AQP4 es la única acuaporina conocida que puede formar estructuras de orden superior en la membrana plasmática: OAP. Estas estructuras OAP ayudan a la polarización de AQP4, ya que facilitan la interacción de esta proteína con la membrana plasmática. En cambio, en algunas regiones cerebrales, como los órganos circunventriculares, al carecer de BBB se puede explicar que por la ausencia de procesos de astrocitos perivasculares no exista una polarización en la distribución de AQP4.

Se ha descrito también la expresión de AQP4 en órganos sensoriales: en las células de Müller en la retina, en el epitelio olfatorio, y en las células de Claudius y Hensen en el oído interno [43]. En una situación análoga al CNS, donde AQP4 se relaciona con astrocitos y no con neuronas, aquí se encuentra asociado a células de sostén, no excitables. La participación de esta proteína en la regulación del volumen celular puede tener una gran importancia en estas células, como por ejemplo en la transducción de señales, ya que los ratones AQP4<sup>-/-</sup> son completamente sordos, pese a no presentar alteraciones morfológicas en el oído interno [59,60].

AQP9 permite el paso tanto de agua como de glicerol, además de algunos solutos de pequeño tamaño, como urea y monocarboxilatos, y se ha identificado en hígado (donde su papel es de especial relevancia en el metabolismo lipídico y en la gluconeogénesis), leucocitos, testículos y en el cerebro de roedores y primates [55]. En CNS, en cambio, se ha descrito la expresión de AQP9 en astrocitos, en los endimocitos y tanicitos que constituyen el espacio periventricular, en las células endoteliales de los vasos piales, y en neuronas catecolaminérgicas y dopaminérgicas del área tegmental ventral y de la *substantia nigra* del mesencéfalo [61]. La presencia de AQP9 en la membrana interna de las mitocondrias en astrocitos ha planteado que esté involucrada en el metabolismo energético. Del mismo modo, se ha observado su regulación al alza en neuronas catecolaminérgicas en ratas diabéticas, indicando la posible participación en el balance energético neuronal [50,62].

Index Cluster #	Name	Description cell types	Gene expression			
			Aqp1	Aqp4	Aqp9	Aqp11
7	TEGLU10	Excitatory neurons, cerebral cortex	-	0,02	-	<b>0,26</b>
9	TEGLU8	Excitatory neurons, cerebral cortex	-	0,01	-	<b>0,27</b>
14	TEGLU5	Excitatory neurons, cerebral cortex	-	0,06	-	<b>0,21</b>
15	TEGLU16	Excitatory neurons, cerebral cortex	-	0,08	-	<b>0,26</b>
16	TEGLU15	Excitatory neurons, cerebral cortex	-	0,05	-	<b>0,35</b>
17	TEGLU17	Excitatory neurons, cerebral cortex	-	0,02	-	<b>0,27</b>
21	TEGLU21	Excitatory neurons, hippocampus CA1	-	0,02	-	<b>0,22</b>
24	TEGLU23	Excitatory neurons, hippocampus CA3	-	0,01	-	<b>0,77</b>
57	TEINH13	Trilaminar cells, hippocampus	-	0,02	-	<b>0,22</b>
69	HBCHO4	Afferent nuclei of cranial nerves III-V	<b>0,39</b>	0,10	-	<b>0,21</b>
73	HYPEP7	Pmch neurons, hypothalamus	-	-	-	<b>1,23</b>
77	MBDOP2	Dopaminergic neurons, ventral midbrain (SNc, VTA)	0,03	0,02	0,01	0,06
131	MEGLU6	Excitatory neurons, midbrain	-	0,05	-	<b>0,36</b>
160	HBINH2	Inhibitory neurons, hindbrain	-	<b>0,50</b>	-	<b>0,23</b>
161	HBCHO1	Cholinergic neurons, hindbrain	0,10	0,10	-	<b>0,20</b>
162	HBCHO2	Cholinergic neurons, hindbrain	-	0,05	-	<b>0,23</b>
165	HBGLU6	Excitatory neurons, hindbrain	-	0,04	-	<b>0,27</b>
167	HBGLU8	Excitatory neurons, hindbrain	-	0,09	-	<b>0,73</b>
185	ENT4	Cholinergic enteric neurons	<b>0,56</b>	0,01	-	0,01
186	ENT5	Cholinergic enteric neurons	<b>0,68</b>	-	-	0,03
188	ENT7	Cholinergic enteric neurons, VGLUT2	0,03	-	-	<b>0,23</b>
194	SYNOR4	Noradrenergic erector muscle neurons	<b>0,84</b>	-	-	<b>0,22</b>
195	SYNOR5	Noradrenergic erector muscle neurons	<b>0,81</b>	-	-	0,02
200	PSPEP6	Peptidergic (TrpM8), DRG	<b>0,63</b>	-	-	0,07
201	PSPEP5	Peptidergic (PEP1.2), DRG	<b>2,93</b>	-	-	0,10
202	PSPEP2	Peptidergic (PEP1.3), DRG	<b>5,70</b>	0,03	-	<b>0,28</b>
203	PSPEP4	Peptidergic (PEP1.1), DRG	<b>2,93</b>	-	-	0,04
204	PSPEP3	Peptidergic (PEP1.4), DRG	<b>4,02</b>	0,01	0,01	0,14
205	PSPEP1	Peptidergicv (PEP2), DRG	<b>2,22</b>	0,01	-	<b>0,35</b>
206	PSNF3	Neurofilament (NF2/3), DRG	0,03	0,03	-	<b>0,42</b>
209	PSNP1	Non-peptidergic (TH), DRG	<b>3,82</b>	0,02	-	0,07
210	PSNP2	Non-peptidergic (NP1.1), DRG	<b>1,49</b>	-	-	<b>0,38</b>
211	PSNP3	Non-peptidergic (NP1.2), DRG	<b>4,19</b>	0,01	-	<b>0,32</b>
212	PSNP4	Non-peptidergic (NP2.1), DRG	<b>0,47</b>	-	-	0,11
214	PSNP6	Non-peptidergic (NP3), DRG	<b>1,43</b>	0,03	-	<b>0,27</b>
224	CHOR	Choroid plexus epithelial cells	<b>1,93</b>	0,05	-	0,07
227	EPEN	Ependymal cells	-	<b>3,61</b>	0,01	0,03
228	EPMB	Ependymal cells, midbrain	-	<b>1,29</b>	0,01	0,04
230	RGSZ	Subventricular zone radial glia-like cells	-	<b>0,43</b>	0,02	0,01
231	ACTE1	Telencephalon astrocytes, fibrous	-	<b>2,94</b>	0,03	0,04
232	ACTE2	Telencephalon astrocytes, protoplasmic	-	<b>1,09</b>	0,04	0,04
233	ACOB	Olfactory astrocytes	-	<b>3,25</b>	0,04	0,12
234	ACNT1	Non-telencephalon astrocytes, protoplasmic	-	<b>2,10</b>	0,03	0,03
235	ACNT2	Non-telencephalon astrocytes, fibrous	-	<b>3,80</b>	0,02	0,04
236	ACMB	Dorsal midbrain Myoc-expressing astrocyte-like	-	<b>10,5</b>	0,04	0,07
237	ACBG	Bergmann glia	-	<b>2,49</b>	0,04	0,01
254	VECA	Vascular endothelial cells, arterial	-	0,02	-	<b>0,21</b>
257	PER1	Pericytes	-	0,01	-	<b>0,23</b>
260	VECV	Vascular endothelial cells, venous	-	0,01	-	<b>0,29</b>

**Tabla 2 XE "" . Patrón de expresión génica de las acuaporinas cerebrales según el tipo celular.** Cada fila representa un tipo celular y la riqueza de expresión de los genes *Aqp1*, *Aqp4*, *Aqp9* y *Aqp11* en ese clúster. Se basa en el cálculo de la frecuencia de expresión en una población celular, empleando un modelo binomial  $\beta$ -Bayesiano (trinarización) de los datos crudos de expresión de cada gen en cada célula de todos los clústers. Así, los valores representados se definen como la frecuencia de expresión del gen en un porcentaje de las células de ese clúster, considerándose positivos aquellos valores  $\geq 0,2$ , con un error de expresión  $< 0,05$ . Tabla elaborada con el recurso digital <http://mousebrain.org>, obtenido de Zeisel et al. 2018 [56].

Se ha sugerido que la similitud en el patrón de expresión de AQP4 y AQP9 en el cerebro de roedores podría indicar que ambas proteínas actúen de forma sinérgica e intervengan en el trasiego de agua entre el CSF y el parénquima cerebral. El análisis de los datos de expresión por *single-cell RNA sequencing* refleja, efectivamente, que la distribución de AQP9 es predominantemente en la línea astro-ependimaria. Sin embargo, su expresión es mucho menor a la observada para *Aqp4*, estando por debajo del valor umbral que considera que la expresión de un gen es positiva en un clúster celular: 0,2 (**Tabla 2**). Así, aunque muy minoritaria, se halló expresión de *Aqp9* en neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral y la *substantia nigra* (#77 – *Dopaminergic neurons: Substantia nigra and Ventral tegmental area*: 0,0146).

De las cuatro acuaporinas identificadas en CNS, AQP11 es la menos conocida. Se sabe que juega un importante papel en la respuesta celular frente al estrés oxidativo, así como en procesos de traducción y plegamiento proteico, al localizarse en el retículo endoplasmático donde participa en su homeostasis al proporcionar un ambiente adecuado para los procesos descritos [63]. Se ha descrito su presencia en cerebelo, concretamente en las dendritas de las células de Purkinje, en neuronas de las regiones hipocámpales CA1 y CA3, en neuronas de la corteza cerebral (capas II – VI), así como en células endoteliales del parénquima cerebral y células epiteliales del CP [14,52]. El análisis por *single-cell RNA sequencing* revela la amplia distribución de *Aqp11* en casi todos los clústeres celulares identificados en dicho estudio, aunque su expresión resulta muy minoritaria y en numerosos casos es inferior al valor umbral. Justamente, se observó una expresión no significativa de *Aqp11* en neuronas en cerebelo, así como en las células de Purkinje (#172 – 178: <0,2), y en células epiteliales del CP (#224 – *Choroid Plexus epithelial cells*: 0,07). En cambio, en otras regiones como hipocampo (#21 – *Excitatory neurons, hippocampus CA1*: 0,22; #24 – *Excitatory neurons, hippocampus CA3*: 0,77; #57 – *Trilaminar cells, hippocampus*: 0,22), en corteza cerebral (#7 – 17: *Excitatory neurons, Cerebral Cortex*: >0,2), y en células del endotelio vascular (#254 – *Vascular endothelial cells, arterial*: 0,21; #257 – *Pericytes*: 0,23; #260 – *Vascular endothelial cells, venous*: 0,29), los datos muestran una mayor presencia de *Aqp11*, validando lo descrito anteriormente. Por último, resulta interesante destacar la fuerte expresión observada en hipotálamo (#73 – *Hypothalamus*: 1,23), por lo que pudiera estar asociado a alguna función endocrina.



### 1.5. Regulación de la expresión de las acuaporinas

Es poco conocida la regulación de las acuaporinas, ya que la mayoría son proteínas que se expresan de forma constitutiva en los tejidos en los que se localizan; no obstante, algunos estudios describen la modulación, tanto al alza como a la baja, de varias acuaporinas en respuesta a diversos estímulos. Los mecanismos mejor conocidos de regulación de estas proteínas tienen lugar a nivel post-traducciona l y transcripcional, afectando a su función por modificación de la permeabilidad del canal, la localización o la abundancia del mismo.

La regulación post-traducciona l de las acuaporinas permite el control de la permeabilidad del canal, y la velocidad del flujo de agua y otras moléculas a través del mismo, y afecta al tráfico y localización celular de las acuaporinas. Se ha sugerido que factores como la fosforilación de residuos aminoacídicos conservados, la unión a iones divalentes y cambios en la osmolaridad o de pH pueden influir directamente en la permeabilidad y en el tráfico celular de varias acuaporinas. Respecto a este último, se reconoció por primera vez para AQP2 en el mecanismo de concentración urinaria renal, siendo el mejor caracterizado hasta la fecha [41,64]. La hormona antidiurética o vasopresina (ADH, del inglés *antidiuretic hormone*) se une a receptores específicos en las células del túbulo renal, y activa una cascada de señalización vía adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y proteín-quinasa A (PKA) que resulta en la fosforilación de AQP2, que a su vez desencadena la translocación y fusión de las vesículas intracelulares que contienen AQP2 en la cara apical de la membrana plasmática de la célula renal, aumentando así su permeabilidad al agua [65]. Otras acuaporinas también reguladas hormonalmente, y cuya fosforilación específica implica la vehiculización hacia membrana plasmática, son AQP1 en hígado, AQP5 en glándulas salivares y lacrimales, y AQP8 en páncreas [66-68]. No se conocen en detalle los mecanismos por los que la fosforilación de estos últimos conduce al reconocimiento de la acuaporina marcada y su posterior translocación a la membrana, aunque se sospecha de la implicación de proteínas SNARE [65]. Recientemente, se ha identificado que la localización subcelular de AQP4 en astrocitos de rata depende de PKA y calmodulina (CaM): en un modelo de edema en el CNS en ratas por daño en la médula espinal, comprobaron que un estímulo hipóxico conduce a un desequilibrio osmótico y a la apertura de los canales TRPV4, con la consiguiente entrada de  $Ca^{2+}$  y activación de CaM; esto conlleva una cascada de activación que conduce a la fosforilación de AQP4 por PKA, y a su unión a CaM, lo que facilita su translocación en la membrana plasmática del astrocito [69].



Los cambios de pH pueden afectar tanto aumentando la permeabilidad al agua y conductancia a iones de algunas acuaporinas (AQP0 y AQP6), o producir el efecto completamente opuesto, reduciendo el flujo de agua y glicerol (AQP3). La exposición de AQP6 y AQP0 a  $Hg^{2+}$  y  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , respectivamente, produce efectos similares a la disminución del pH, aumentando la permeabilidad al agua del canal. AQP3, por contra, en presencia de iones divalentes, ve reducido el movimiento de agua a su través [70]. Pese a las dudas que se plantean sobre el significado fisiológico de la activación de acuaporinas, es sabido el papel fundamental que juega en el mantenimiento del equilibrio hídrico de todo el cuerpo, ya que la respuesta biológica que desencadena el tráfico de acuaporinas es más rápida que la que se puede lograr a nivel transcripcional.

La regulación transcripcional de AQP2 es uno de los ejemplos mejor entendidos y tiene lugar por unión de la ADH a promotores específicos que inducen la transcripción del gen *Aqp2*, lo que resulta de particular importancia en el mecanismo de concentración urinaria [65,71]. Mediante análisis *in silico* del promotor de *Aqp2* se reveló que existe una gran diversidad de secuencias conservadas para su regulación y, por estudios a nivel molecular, se han podido identificar factores de transcripción específicos [72] para este propósito. Se ha comprobado que, de forma análoga, existen sitios de activación por ADH en el promotor de *Aqp1*, aunque no se han podido correlacionar mediante ensayos *in vivo* o *in vitro* la funcionalidad de estas secuencias en la regulación del gen por factores de transcripción. Se ha documentado que existe una regulación en la expresión de AQP1 en respuesta a estrés osmótico celular, donde se produce un aumento en los niveles de mRNA y de la proteína, por la presencia de elementos de respuesta a hipertonidad en la región promotora de *Aqp1* [73] en células del túbulo proximal renal humano. Un efecto similar se observa en presencia de algunos fármacos esteroideos [74] como la dexametasona, a nivel renal y pulmonar. En cultivos primarios de tejido epitelial de pulmón de ratón tratados con forskolina (terpenoide derivado de la planta *Coleus forskholii*) o con isoproterenol (fármaco agonista  $\beta$ 2-adrenérgico) se ha podido observar el aumento en los niveles de AMPc, dependiente de PKA, conduciendo a un aumento en la síntesis de mRNA de AQP5 y de la proteína, así como la translocación de la misma a la membrana plasmática [75].

La regulación de la expresión por hipoxia (Hx) de algunas acuaporinas también ha sido documentado. Una situación de ambiente hipóxico natural es la que se establece en grupos de población o viajeros de alta montaña, donde la menor disponibilidad de  $O_2$  conlleva a una adaptación fisiológica como respuesta. Diversos estudios han propuesto mecanismos por los cuales la Hx supone un factor en el desarrollo de enfermedades como el edema cerebral y

pulmonar por mal de altura o montaña. El papel relevante que tienen las acuaporinas en estos procesos ha sido estudiado, especialmente tras demostrarse que la Hx cambia el patrón de expresión de estas proteínas, asociándose a cambios en la permeabilidad al agua en los tejidos donde se localizan [36,76,77].

Como se ha descrito anteriormente, se pudo comprobar que los niveles de mRNA de *Aqp1* en tejido pulmonar y cerebral de ratas expuestas a Hx corta (10% O<sub>2</sub> durante 24 y 48 horas) eran superiores a los mostrados en normoxia (Nx), sugiriendo que existe un mecanismo de regulación de expresión génica de esta acuaporina como respuesta fisiológica a Hx [36]. AQP1 en cerebro se expresa exclusivamente en las células epiteliales del CP y la regulación al alza de su mensajero en animales expuestos a Hx permitió proponer que esta proteína participe en la formación del CSF.

El estudio del promotor de *Aqp1*, mediante modelos murinos genéticamente modificados (AQP1<sup>-/-</sup>) y líneas celulares endoteliales de ratón (EOMA), permitió desvelar el mecanismo molecular que subyace en su regulación por oxígeno, y demostró ser dependiente del tiempo de exposición y de la intensidad de la Hx, siendo la inducción más pronunciada cuanto mayor fuera el tiempo que se mantenía la condición de Hx y cuanto menor era el nivel de O<sub>2</sub>. El empleo de los compuestos químicos dimetiloxaloliglicina (DMOG) y CoCl<sub>2</sub>, usados para mimetizar la situación de Hx, permitió plantear por primera vez la posible implicación de HIF (del inglés *Hypoxia-Inducible Factor*) en la regulación de AQP1, y esta se pudo demostrar tras observar que el bloqueo de HIF-1 $\alpha$ , mediante el empleo de ARN de interferencia (iRNA) específico para este factor, reducía de forma significativa la inducción por Hx de la expresión de AQP1 tanto a nivel de mensajero como de proteína [77]. Otros estudios sugieren que además de la acción de HIF-1 $\alpha$  sobre el promotor de AQP1, existan otras vías de activación, así como otros factores de transcripción que actúen, bien de manera independiente o en colaboración con HIF-1 $\alpha$  en la regulación de AQP1 por Hx [78].

Al igual que otras acuaporinas anteriormente mencionadas, la regulación de la actividad de AQP4 puede ser post-traducciona, lo que supone una respuesta rápida, o transcripcional, a más largo plazo. Experimentos de Hx aguda a corto plazo (8% O<sub>2</sub> en 8 horas), han mostrado la regulación al alza en los niveles de mRNA de *Aqp4*, lo que se traduce en un aumento en la expresión para esta proteína, en corteza de ratón. El mismo factor hipóxico estimula la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) que actúa sobre su propio receptor, activando una cascada de señalización vía AMPc/PKA que produce, en último término, la fosforilación de AQP4 y su vehiculización hacia la membrana plasmática del

astrocito, aumentando su permeabilidad al agua, lo que contribuye al desarrollo de edema cerebral [79].

## 2. EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO Y SU HOMEOSTASIS

La regulación de los fluidos en el CNS está estrictamente controlada. Esta regulación facilita un adecuado equilibrio entre el medio intra- y extracelular celular y permite el correcto funcionamiento neuronal. Además, este riguroso control del equilibrio hídrico en el CNS presenta una característica particular en relación al entorno en el que se aloja el cerebro: el cráneo confiere protección mecánica al tejido cerebral frente a traumatismos, pero a su vez supone una estructura rígida y cerrada donde albergar un exceso de líquido, por ejemplo, como consecuencia de la formación de edemas, conlleva aumentos muy elevados de la presión intraventricular (IVP).

La homeostasis de los fluidos cerebrales se basa en la regulación de cuatro compartimentos líquidos que deben estar en permanente equilibrio: (1) la sangre que llega al CNS, (2) el CSF, que es una secreción procedente de la filtración del plasma circulante, y (3) el líquido intersticial cerebral (ISF), que llena el espacio extracelular (ECS) entre las neuronas y la glía y (4) el líquido intracelular. La cantidad de líquido que hay en estos compartimentos está estrictamente controlada, ya que es importante para mantener un equilibrio iónico adecuado para la función neuronal y para evitar que haya alteraciones significativas de la IVP. Sin embargo, los mecanismos que regulan estos procesos no son todavía del todo conocidos.

### 2.1. Hipótesis clásica de la circulación del líquido cefalorraquídeo

La primera mención del término “agua cerebral” puede atribuirse a los antiguos egipcios, hace más de 2.500 años. Desde entonces, se ha considerado al CSF desde un exudado acuoso síntoma de algunas enfermedades, hasta ser el origen del alma. En el siglo XVI, el médico Andreas Versalius describió con gran rigor la anatomía cerebral, e incluso calculó el volumen de CSF (o “fluido acuoso”, como él lo definía) que rodeaba al cerebro y que albergaba en su interior, siendo de aproximadamente la sexta parte del volumen total cerebral [80]. Hoy en día, sabemos por técnicas de resonancia magnética que supone  $\approx 18\%$  del total, por lo que es de destacar la precisión de las estimaciones de Versalius dada la falta de técnicas modernas. Desde entonces y durante muchas décadas, se asumió que la única función de este fluido era la protección física del cerebro. En los siglos posteriores, diversos anatomistas detallaron que el CSF fluye a través de todo el sistema ventricular cerebral, se conduce a lo largo del canal

central de la médula espinal, y desemboca en el SAS, aunque no pudieron discernir la dirección del flujo del CSF. A finales del siglo XIX, Heinrich Quincke introdujo la técnica de la punción lumbar para la toma de muestras de CSF de pacientes vivos [81], lo que supuso el comienzo del estudio de la dinámica del CSF, producción, composición y distribución del mismo, sirviendo así mismo de herramienta para el diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades.

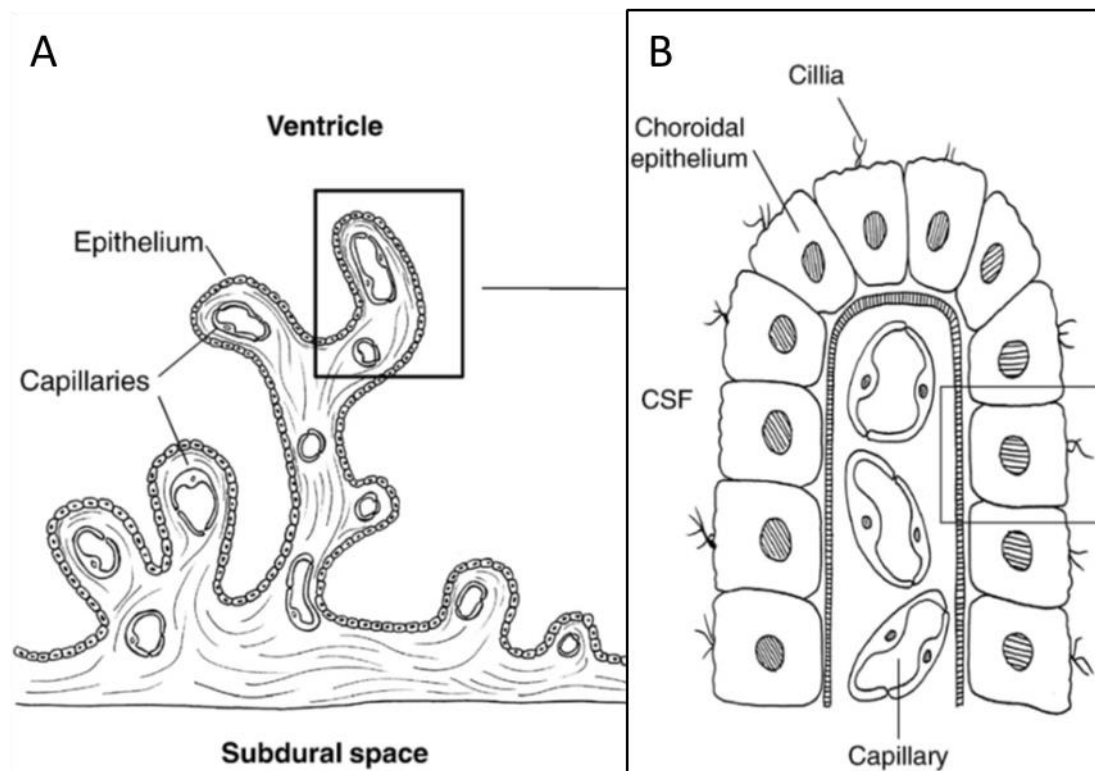
A principios del siglo XX, estudios experimentales llevados a cabo por diversos fisiólogos permitieron definir una forma de comprender la homeostasis del CSF, la cual fue aceptada de forma generalizada durante décadas. Esta circulación “clásica” propone unas sencillas premisas, consistentes en:

1. El establecimiento de un flujo unidireccional y pulsátil desde los CP, la principal zona de producción de CSF.
2. Circulación por gradientes de presión hidrodinámicos desde los ventrículos laterales, pasando a través del foramen de Monro hasta el tercer ventrículo, y fluyendo, a continuación, a través del acueducto de Silvio hasta el cuarto ventrículo. Desde el cuarto ventrículo, el CSF sale lateralmente por el foramen de Luschka hacia el SAS que recubre la corteza cerebral, o medialmente por el foramen de Magendie, llenando el canal central de la médula espinal.
3. Una vez ha recorrido todo el circuito, el CSF se drena desde el SAS a través de las granulaciones aracnoideas a los senos venosos, principalmente en el seno sagital superior. También existe drenaje, aunque menor, a los vasos linfáticos a través de la lámina cribosa en la mucosa nasal (**Figura 5**).

Con estas premisas, se planteó el concepto de “tercera circulación” para el movimiento del CSF en el CNS, además de la sanguínea y linfática, término introducido por Cushing en 1.926 [82]. Desde entonces, no se cuestionó la dinámica del CSF, asumiendo su producción desde los CP. Anatómicamente, el CP está flotando en el CSF de los ventrículos laterales, tercer y cuarto ventrículos, y presenta una única capa de células epiteliales que cubren los numerosos capilares que lo vascularizan (**Figura 6**). Este tejido forma una barrera entre la sangre y CSF, en la cual las células epiteliales coroides están selladas en su extremo apical mediante uniones estrechas [83,84].

Desde hace casi un siglo se postuló que la formación del CSF se debe a la actividad secretora de los CP en los ventrículos cerebrales, sustentado inicialmente por los experimentos realizados por Walter E. Dandy en 1.919. En estos experimentos, se llevó a cabo una

plexectomía coroidea en uno de los ventrículos laterales de un perro, y ocluyó las vías de evacuación de CSF conocidas, el foramen de Monro y acueducto de Silvio. Los resultados reportados indicaban el colapso del ventrículo sin CP y la dilatación del otro, concluyendo que los CP secretaban activamente CSF: “De estos experimentos tenemos la prueba absoluta de que el líquido cefalorraquídeo se forma a partir del plexo coroideo”. De forma simultánea, se postuló que “el epéndima que revisten los ventrículos no intervienen en la producción de líquido cefalorraquídeo” [85]. Posteriormente, el trabajo realizado por Keasley Welch en 1.963 fue crucial para respaldar la hipótesis de W. Dandy, ya que proporcionó pruebas más directas de la sangre coroidea como fuente del CSF [86]. Se demostró que el hematocrito de la sangre de la vena coroidea principal era más alto que en la arteria coroidea anterior, concretamente 1,15 veces mayor, lo que sugiere una pérdida de volumen plasmático a medida que la sangre pasaba a través del CP. A partir de este dato y del flujo sanguíneo en la arteria coroidea, se pudo estimar la tasa de secreción de CSF, que en humanos es aproximadamente 0,3–0,4 ml/min (producción total diaria 430–580 ml). Dado que se tardan entre 7 y 9 horas en reemplazar los 160 ml de CSF que suponen el volumen total del sistema, se estima que todo el circuito se regenera hasta 3 veces al día [87].



**Figura 6. Esquema estructural del CP.** (A) Estructura ramificada del CP con vellosidades que se proyectan hacia el ventrículo del cerebro. (B) Cada plexo consiste en una red de capilares cubiertos por una sola capa de células epiteliales cuboidales. Los capilares del CP están formados por células endoteliales fenestradas que permiten el paso de agua y pequeños solutos, y contribuyen de forma fundamental a la producción del CSF. Modificado de Orešković & Klarica, 2010. [88]

La recolección y análisis del CSF recién secretado desde los CP permitió a Ames et al. revelar que su composición era similar a la de un filtrado del plasma sanguíneo, aunque con algunas diferencias. Por ejemplo, el CSF tiene una mayor concentración en iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , pero más bajo en  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , glucosa, aminoácidos y urea en comparación con el plasma. Además, la limitación física que ejercen las células que envuelven el endotelio vascular cerebral, restringe el tamaño de las moléculas que pueden alcanzar el CSF desde el plasma sanguíneo, ya que en su composición hay menos de un 0,5% de los niveles de proteínas plasmáticas [89]. En cambio, algunas moléculas de pequeño tamaño transportadas en la sangre como péptidos u hormonas, como la leptina, pueden pasar al CSF a través de mecanismos de transporte selectivos presentes en las células epiteliales del CP y en las células endoteliales de la BBB [90].

La caracterización de las acuaporinas a principios de los años 90 como “canales de agua” ayudó a mejorar la comprensión que se tenía del concepto “clásico” de circulación del CSF, y más concretamente en la formación del mismo, al observarse que el CP se encontraba entre los tejidos con mayor expresión de AQP1 del organismo [91]. La polarización de esta proteína y otros cotransportadores, como la anhidrasa carbónica o la  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$ , en la membrana apical del epitelio coroidal permite que se establezca un bombeo activo de iones hacia el ventrículo, por lo que se propuso que AQP1 podría desempeñar un papel destacado, facilitando el paso del agua, en la formación del CSF [92]. En este sentido, estudios realizados en ratones mutantes del gen de *Aqp1* ( $\text{AQP1}^{-/-}$ ), mostraron que la tasa de producción de CSF se redujo más de un 20% respecto a ratones wt. El mismo estudio reveló una disminución significativa en la IVP, mostrando el importante papel que desempeña AQP1 en la formación del CSF desde los CP [93].

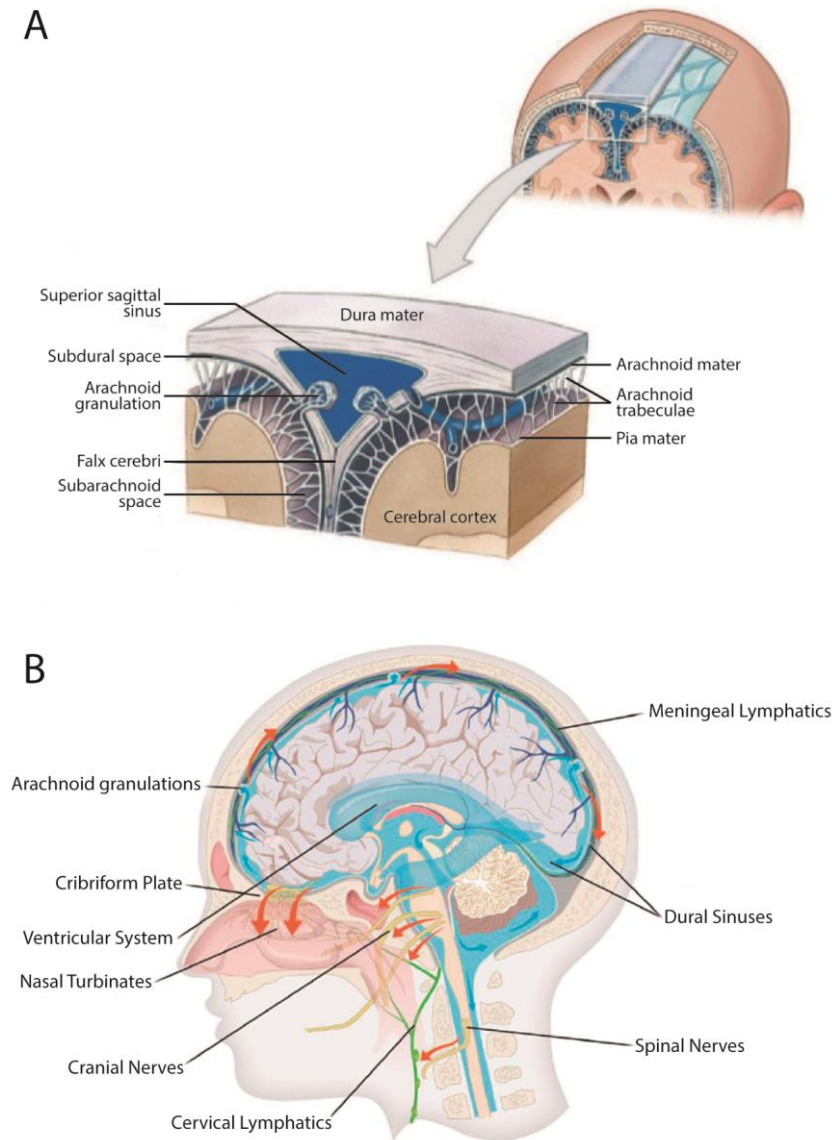
A diferencia de la mayoría de epitelios secretores en los que el agua se mueve tanto trans- como intercelularmente, en el epitelio del CP, la vía intercelular es casi inexistente. El movimiento del agua es en su mayor parte transcelular. AQP1 se ha localizado principalmente en la membrana apical, facilitando el paso de agua hacia el espacio ventricular. El mecanismo de transporte de agua por la membrana basolateral no está tan bien definido, habiéndose sugerido transporte de agua mediante difusión simple, por difusión facilitada mediada por AQP1, e incluso algunos autores han asociado a AQP4 con el transporte de agua por este lado de la membrana [94].

Tradicionalmente, se ha asumido que la formación del CSF es un proceso activo, y que su circulación a través de los ventrículos cerebrales desde los CP resulta del bombeo pulsátil sanguíneo producido por el latido cardíaco. Cada pulso genera un flujo unidireccional hacia los

ventrículos que fuerza al CSF a salir del circuito a través de las vías de drenaje, de manera que, en condiciones fisiológicas, la cantidad de CSF que se secreta hacia los ventrículos debe ser la misma que se absorbe, estando ambos procesos en equilibrio [95-97]. De ahí que se haya aceptado de forma generalizada que la formación y circulación del CSF se deben, mayoritariamente, al establecimiento de un gradiente de presión hídrico, ayudado por la acción ciliar del epéndima ventricular, y que impulsa el CSF a través de los ventrículos, hacia las vías de absorción. Del mismo modo, debía de existir una mayor presión hidrostática en las vellosidades aracnoideas que en los senos venosos, permitiendo la evacuación o drenaje del CSF. Un desequilibrio entre la producción y evacuación del CSF, con el tiempo, desembocará en un proceso patológico.

Desde un punto de vista anatómico, la percepción clásica de drenaje del CSF parte de la observación macroscópica de las granulaciones aracnoideas realizadas por Antonio Pacchioni a principios del siglo XVIII, y microscópica de las vellosidades aracnoideas por Lewis Weed a principios del siglo XX. Estas estructuras se proyectan desde el SAS hasta el seno venoso dentro de la duramadre. Estos hallazgos supusieron la base para la comprensión del fenómeno de la absorción del CSF, estableciéndose que estas “son regiones obvias para el drenaje del CSF hacia el sistema vascular” [99]. Esta afirmación se basa en los experimentos realizados por L. Weed en los que se inyectaron soluciones isotónicas de colorantes en el CSF de gatos a bajas presiones, observándose su distribución en todo el espacio del CSF y las vellosidades aracnoideas hasta alcanzar la pared dural del seno venoso sagital [100] (**Figura 7A**). En experimentos anteriores, Key y Retzius ya habían propuesto estas estructuras como principal punto de absorción de CSF, y además evidenciaron la existencia de un drenaje accesorio a través del sistema linfático procedente de los nervios cervicales y espinales, y de la lámina cribosa que conducen a la mucosa nasal [101] (**Figura 7B**).

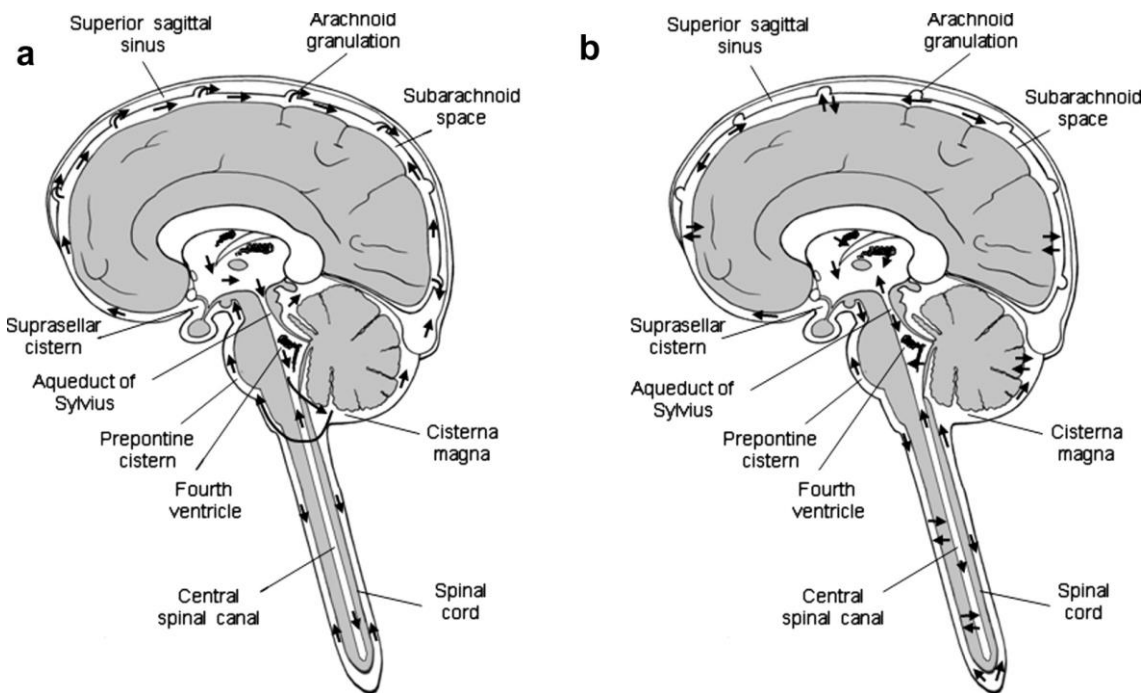




**Figura 7. El drenaje del CSF en humanos.** (A) Imagen de un plano coronal en el que se representan las granulaciones aracnoideas y senos venosos duros. Las granulaciones aracnoideas son protuberancias de la membrana aracnoidea donde el CSF fluye hacia el seno venoso sagital a través de la duramadre, y constituye el único sitio de salida conocido que drena directamente al torrente sanguíneo. Con una función similar a una válvula, al aumentar la presión generada por el CSF, aumenta la superficie de intercambio de las granulaciones aracnoideas con la sangre, y el drenaje del CSF se incrementa. Modificado de *Pearson Education Inc*, 2012. (B) Representación de las principales vías de salida del CSF (flechas rojas) y el sistema linfático del CNS: a través de la lámina cribosa y del nervio olfatorio, hacia los vasos linfáticos de la mucosa nasal; a través de los nervios cervicales y espinales en los ganglios cervicales de la base del cráneo; desde los vasos linfáticos meníngeos, a través de los senos venosos duros. Modificado de Rasmussen et al., 2018 [98].

## 2.2. Nueva concepción en la homeostasis del líquido cefalorraquídeo

Actualmente es objeto de debate un nuevo enfoque de la dinámica del CSF, el cual abandona el concepto de secreción, flujo y drenaje en zonas específicas dentro del CNS. En contra de la hipótesis “clásica”, nuevos hallazgos experimentales sugieren que la producción del CSF no sólo tiene lugar exclusivamente en el CP, ni que fluye unidireccionalmente hacia las vías de drenaje, en las vellosidades aracnoides. En su lugar, se propone que la producción y drenaje del CSF es continua en todo el sistema, existiendo un intercambio constante de líquido entre los ventrículos cerebrales, el fluido intersticial, la sangre y el parénquima, impulsado por fuerzas osmóticas e hidrostáticas [60,88], lo que revela que la homeostasis del CSF es, de hecho, mucho más compleja (**Figura 8**).

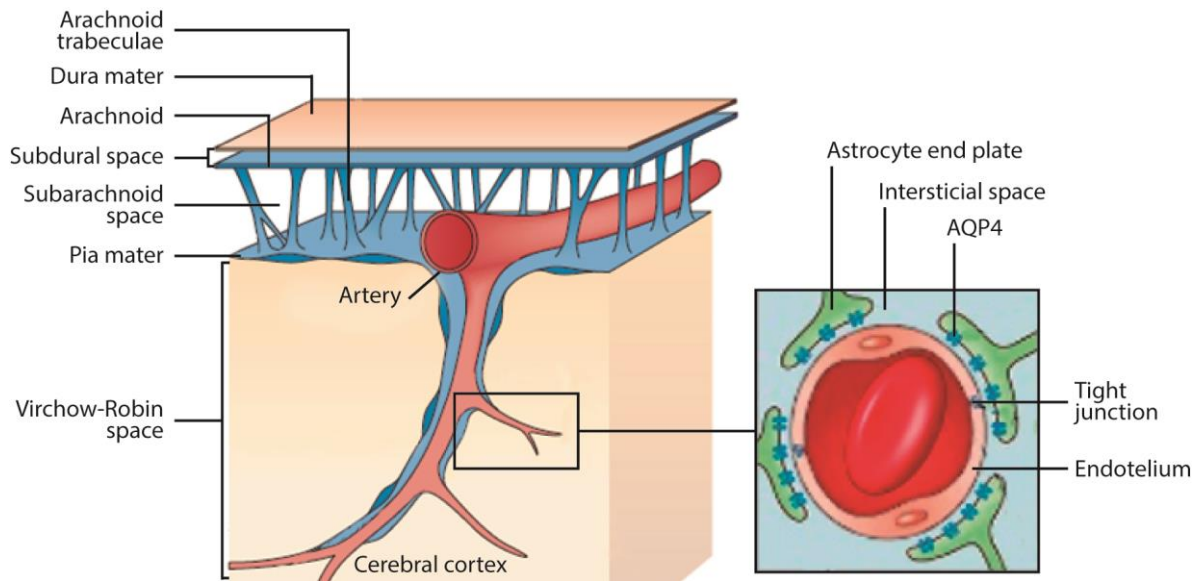


**Figura 8. Esquemas de la dinámica del CSF.** En gris se muestra el CNS mientras que el CSF es representado en blanco. Las flechas negras indican la dirección de la circulación y los puntos de absorción. (A) Representación esquemática de la hipótesis “clásica”. (B) Esquema de la nueva concepción en la dinámica del CSF. Las flechas representan el intercambio libre de agua en todo el sistema, dependiendo de las fuerzas hidrostáticas y osmóticas, entre el CSF, el ISF y los capilares sanguíneos. Modificado de Klarica et al., 2013. [107]

Tradicionalmente se ha responsabilizado a los CP de la producción del 80-90% del total de CSF producido, basado originalmente en las observaciones de Dandy y Welch [85]. Sin embargo, diversos investigadores han criticado las interpretaciones de estos estudios debido a

que la metodología experimental no representaba la verdadera fisiología del sistema, a la imposibilidad de reproducir los resultados de los experimentos realizados por Dandy, y que las conclusiones estaban basadas en un único sujeto de estudio [102,103]. Según la teoría “clásica”, la plexectomía coroidea debería reducir significativamente la secreción de CSF y, por tanto, servir para disminuir la IVP en pacientes con hidrocefalia. Sin embargo, se ha mostrado que dos de cada tres pacientes intervenidos con plexectomía coroidea no mostraban mejoría clínica y requerían de drenajes de CSF para el tratamiento de su hidrocefalia [104]. La tasa de producción de CSF en los pacientes plexectomizados disminuyó sólo en un 30% respecto de los no intervenidos y, no se encontraron cambios en la composición del CSF entre ambos grupos [105]. Además, como se ha mencionado anteriormente, los ratones AQP1<sup>-/-</sup> mostraron una disminución en la producción de CSF del ≈20% respecto al wt [93]. Todo ello ha llevado a considerar que la producción de CSF por el CP, donde el transporte de agua está facilitado por AQP1, representa solo una parte de la producción total de CSF, y que por tanto una gran parte del CSF producido debía de provenir de una fuente extra-coroidea [106].

Por otro lado, numerosas evidencias experimentales indican que una parte importante de la producción y drenaje del CSF se produce mediante el continuo intercambio CSF – ISF que se produce en los espacios perivasculares o espacios de Virchow-Robin (VRS). Como se observa en la **Figura 9**, estos VRS son canales perivasculares que rodean las arterias y venas que penetran desde el SAS hacia el parénquima cerebral, atravesando la piamadre, y que permiten el intercambio bidireccional de fluidos entre los compartimentos extracelular y subaracnoideo [108]. Los pies de los astrocitos que tapizan estos canales se consideran que controlan el intercambio CSF - ISF en un proceso en el que AQP4 desarrolla un papel principal. Por tanto, estos espacios perivasculares y la superficie pial, que en ambos casos está recubierta por pies astrocitarios en los que se encuentra AQP4, se considera actualmente una importante fuente extra-coroidea que contribuye a la formación de CSF y a su drenaje [109,110]. En este sentido, experimentos en los que se administró por vía intravenosa agua marcada con <sup>17</sup>O (isótopo poco abundante de oxígeno; H<sub>2</sub><sup>17</sup>O) y se midió por imágenes de resonancia magnética (MRI) su entrada en los ventrículos laterales, mostraron que la entrada H<sub>2</sub><sup>17</sup>O en los ventrículos laterales se reducía significativamente en ratones AQP4<sup>-/-</sup> respecto a ratones wt. Además, no se encontraron diferencias significativas entre ratones AQP1<sup>-/-</sup> y controles wt, concluyéndose que la contribución de AQP4 en la producción del CSF debía ser más importante que la de AQP1 [111]. También se ha descrito, mediante experimentos con iRNA, que una menor expresión de AQP4 en astrocitos se relaciona con un descenso en la movilidad del agua dentro del tejido cerebral [112].



**Figura 9. Morfología del espacio perivascular o de Virchow-Robin.** El VRS es la zona delimitada por las membranas piales y gliales que rodea los vasos que penetran en el parénquima cerebral. La envoltura de la piamadre se extiende a lo largo de la vasculatura arterial en el VRS, volviéndose más fenestrada y, finalmente, desaparecer en la sección capilar. AQP4 está intensamente polarizada en cerebro en los pies de los astrocitos perivascuales del ERV (ampliación) y de la glía limitante externa. Modificado de Ransohoff et al., 2012 y Nakada et al., 2017 [113,114].

Experimentos seminales para entender esta nueva concepción de la homeostasis del CSF fueron los realizados por Helen Cserr y colaboradores en los años 80, en los que revelaron que debían de existir vías especializadas que permitieran el flujo convectivo de ISF a través de vías especializadas en el cerebro, mediante las cuales el ISF se intercambiaría y/o drenaría al CSF. [115,116]. En estos experimentos se inyectaron sustancias trazadoras (dextrano azul y peroxidasa de rábano) directamente en el núcleo caudado, para analizar la cinética y la ruta de aclaramiento de estas sustancias como una medida indirecta de la formación de ISF [117]. Aunque la presencia de estas sustancias en puntos cercanos al lugar de inyección se explicaba por simple difusión a través del ECS cerebral, no podía justificarse su presencia a lo largo de los espacios perivascuales de los vasos sanguíneos, en la materia blanca y dentro de la región subependimaria mediante difusión. Por tanto, esta distribución de las sustancias trazadoras sólo podía interpretarse por la existencia de un transporte o flujo convectivo que permitiera una distribución rápida de dichas sustancias en el cerebro. Diversos estudios realizados posteriormente con trazadores de pesos moleculares y coeficientes de difusión distintos, han confirmado la existencia de estas vías de transporte convectivo, entre las que se encuentran, principalmente, los espacios perivascuales y, en menor grado, la sustancia blanca.

Actualmente existe un amplio consenso en que dichos espacios perivasculares son un lugar principal de intercambio CSF – ISF, constituyendo una importante fuente extra-coroidea de producción de CSF [118].

El desarrollo de nuevas metodologías de imagen ha permitido un mejor conocimiento de la circulación del CSF en el CNS. Mediante la técnica de resonancia magnética de contraste de fase, que sincroniza la adquisición de imágenes con el ciclo cardíaco, se ha evidenciado un flujo pulsátil de CSF a través del sistema ventricular [119]. Así, durante la sístole cardíaca, el CSF se desplazará caudalmente a razón de 4,14–16,52 ml/min; en cambio, durante la diástole, retornará rostralmente de 3,52–12,17 ml/min. Sobre estos datos, el flujo promedio en adultos sanos calculado fue de  $0,77 \pm 0,38$  ml/min [120], excediendo hasta en dos veces la tasa de producción de CSF coroidal estimada años atrás a partir de los experimentos de Welch y colaboradores (0,3–0,4 ml/min) [86], lo que resultaba contradictorio si, en base a la teoría “clásica”, se consideraban a los CP como la fuente del 80-90% del CSF producido. Si bien, la dirección neta del CSF es caudal, el carácter pulsátil del flujo facilitaría el mezclado de todos los compuestos contenidos en los distintos espacios del sistema ventricular, apoyando la actuación del CSF como circuito para la eliminación de productos de desecho del cerebro.

Ya que la mayor velocidad de flujo de CSF se corresponde con la sístole cardíaca, cuando se alcanza la mayor presión arterial sistémica, se cree que el efecto hiperémico por el aumento de volumen y presión de la sangre que llega al tejido cerebral y a los plexos genera una compresión transitoria en los ventrículos que se desplaza hacia los sitios de drenaje, facilitando el movimiento del CSF. La respiración es otro factor que contribuye al carácter pulsátil del flujo de líquido, ya que como sugieren algunos autores, el efecto hiperémico antes comentado se reduciría por la depresión respiratoria causada, por ejemplo, por ansiolítico, anestésicos o barbitúricos [121]. De forma paralela, se comprobó en un estudio realizado en adultos que la producción de CSF puede variar en función de la fase del ciclo circadiano. El pulso máximo de producción calculado fue de 0,7 ml/min durante la fase de sueño, a las 02:00, mientras que el mínimo fue de 0,2 ml/min, en fase de vigilia, a las 18:00 [119]. Esto indica que existen grandes variaciones en el flujo de CSF, desde 300–1000 ml al día. Parece evidente pensar que la vejez, por su asociación en múltiples ocasiones con patologías cardiovasculares o respiratorias, puede ser también otro factor capaz de generar cambios en la tasa de producción y variaciones en el flujo de líquido, y desencadenar edema por alteraciones en la circulación y/o intercambio de CSF – ISF. Por tanto, basándose en estos hallazgos, el nuevo enfoque considera que la circulación parece mucho más compleja y que se deba, probablemente, a la combinación de un continuo flujo pulsátil caudal-rostral y bidireccional

entre las barreras que separan los compartimentos de fluidos cerebrales (sangre – BBB – ISF – barrera endotelial – CSF).

Respecto a las vías de drenaje, según la hipótesis clásica, se ha establecido que la absorción del CSF tiene lugar principalmente a través de las vellosidades aracnoideas y sólo un 10-15% se drena por vías linfáticas, considerándola una ruta accesoria en casos de elevada presión en el sistema ventricular, en determinadas condiciones patológicas. Recientemente, con el objetivo de estudiar la contribución del drenaje linfático en la absorción del CSF, Boulton y colaboradores, analizaron la presencia de una sustancia trazadora inyectada en el CSF tras realizar una ligación de los vasos linfáticos cervicales. Al analizar el contenido del marcador en el plasma, concluyeron que casi un 50% era absorbido por esta vía, demostrando que la contribución del sistema linfático en el transporte de fluidos es mayor a la estimada inicialmente, y debía de considerarse no sólo como una vía secundaria de drenaje del CSF [122]. Asimismo, se conoce que el desarrollo de las vellosidades aracnoideas tiene lugar después del nacimiento, por lo que se sugiere que deben existir mecanismos alternativos de drenaje del CSF durante el período prenatal, y que persistan después del mismo. Por ello, algunos autores discrepan del papel principal clásicamente atribuido a las granulaciones aracnoideas en el drenaje del CSF. En un experimento realizado en ovejas en el que se inyectó albúmina sérica radioyodada en el CSF se comprobó que a presiones bajas la mayor parte del drenaje ocurre a través de los vasos linfáticos cervicales y de la lámina cribosa en la mucosa nasal. En cambio, a presiones elevadas se registró una mayor señal del marcador en la confluencia de los senos venosos intracraneales, zona a la que drenan las vellosidades aracnoideas [123]. En resumen, los nuevos datos experimentales indican que, además de las vellosidades aracnoideas, el drenaje por las vías linfáticas asociadas a los nervios craneales y espinales tiene una contribución importante al drenaje total del CSF. Además, en los últimos años se ha descrito la existencia de una nueva vía de drenaje asociada a vasos linfáticos meníngeos, aunque su contribución en términos cuantitativos al drenaje del CSF aún debe ser establecida [124].

### 3. PAPEL DE LAS ACUAPORINAS ASOCIADO A PATOLOGÍAS DE LOS FLUIDOS CEREBRALES

Numerosas evidencias experimentales obtenidas durante los últimos años han mostrado que las acuaporinas cerebrales, principalmente AQP1 y AQP4, están implicadas en la homeostasis del CSF. Por ello se considera que las acuaporinas desempeñan un papel importante en el desarrollo de distintas patologías asociadas a un desequilibrio en la producción, intercambio o drenaje del CSF.

Lesiones cerebrales isquémicas y traumáticas se asocian con una interrupción de la circulación del CSF o de un adecuado intercambio CSF – ISF. Como consecuencia de estas lesiones se suele desarrollar un edema cerebral, produciendo un aumento de la IVP que disminuirá la perfusión tisular. Dicha disminución de la perfusión dificulta la regeneración del tejido dañado y además puede producir daño isquémico en zonas de tejido sano adyacente. Otras circunstancias patológicas como meningitis bacterianas, tumores o hemorragias subaracnoideas conllevan normalmente una disminución en el drenaje del CSF, acumulación del mismo y aumento de la IVP. El rango normal de IVP en adultos sanos es de alrededor de 5-15 mmHg, considerándose valores patológicos para elevaciones de hasta los 30 mmHg, y mortales de 40 mmHg [125]. Un aumento crónico de la IVP se relaciona con pérdida de visión, edema e hidrocefalia, pudiendo causar, en último término, la muerte. A continuación, se muestran algunas de las patologías del CNS asociadas a alteraciones en la dinámica del CSF y su relación con las acuaporinas, haciendo especial mención a la patología de la hidrocefalia, por ser la patología de estudio de este trabajo.

#### ***Edema***

El edema cerebral se caracteriza por la acumulación de un exceso de fluido en el parénquima cerebral. Aunque en tejidos periféricos las consecuencias del edema suelen ser menores, en el tejido cerebral, al estar rodeado de una estructura rígida como el cráneo, dicho aumento de fluido tiene como consecuencia un aumento de la IVP, disminución de la perfusión sanguínea y un evento isquémico.



Actualmente el edema cerebral se clasifica en tres categorías en función de la integridad de la barrera hematoencefálica: (i) Edema citotóxico, caracterizado por una acumulación de fluido intracelular sin disrupción de la BBB. Este se produce, normalmente, como consecuencia de accidentes cerebrovasculares isquémicos o hipóxicos, hiponatremia, por intoxicación hídrica u otros agentes tóxicos, como organofosforados y se caracteriza por un aumento del volumen de los astrocitos y dendritas. (ii) Edema iónico, que se corresponde con las primeras fases de lo que clásicamente se ha llamado edema vasogénico. En este tipo se produce un flujo transcipilar de iones sodio en las células endoteliales, pero aún la BBB permanece intacta. (iii) Edema vasogénico, en el cual, tras la fase de edema iónico, se produce la rotura de la BBB y proteínas plasmáticas se extravasan al ECS.

Como se ha explicado anteriormente, cualquier variación en los niveles de expresión de las acuaporinas puede alterar la permeabilidad al agua de las membranas celulares. Debido a ello, resulta de interés estudiar cómo están involucrados estos cambios de expresión en el desarrollo y resolución de patologías relacionadas con el movimiento de agua, como el edema cerebral.

Diversos estudios sugieren la participación de AQP1 en la resolución del edema ocasionado por lesiones en el CNS, al registrarse un aumento en su expresión en axones de neuronas sensitivas, células endimarias y astrocitos próximos al tejido dañado tras hemorragias subaracnoideas y lesiones en la médula espinal [126,127].

Se ha descrito una mayor presencia de AQP9 en astrocitos reactivos tras una lesión isquémica, aunque no se ha encontrado relación directa con el desarrollo del edema. Se ha postulado que el aumento de AQP9 pudiera estar más relacionado con el estrés metabólico en neuronas y la astrogliosis posterior a la lesión [128].

Los primeros estudios en modelos de ratón a los que se les inducía isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral medial, relacionaron un aumento en la expresión de AQP4 con el desarrollo de edema iónico y aumento del volumen de los podocitos de astrocitos. El aumento de AQP4 se correspondía con la severidad del daño, lo que implicaba la participación de esta proteína en la aparición de los daños iniciales que se establecen con el desarrollo del edema [128,129]. En esta línea, otros estudios realizados en ratones AQP4<sup>-/-</sup> a los que se les había inducido isquemia revelaron que, en los primeros momentos tras el accidente cerebrovascular, la ausencia de AQP4 se asociaba con una disminución del edema y un menor



daño tisular, medido a partir de MRI. Pareciera así, que la ausencia de AQP4 tiene un efecto beneficioso a largo plazo con un mejor pronóstico. No obstante, se constató que estos ratones AQP4<sup>-/-</sup> presentaban un agrandamiento de sus hemisferios cerebrales respecto de los ratones WT tras el proceso isquémico, indicativo de una mayor acumulación de agua en estos ratones [130].

Además de en la formación, se ha estudiado también la participación de AQP4 en la resolución del edema cerebral. De hecho, se ha observado que el aumento de expresión de AQP4 está más estrechamente asociado a la resolución del edema que a la formación del mismo, ya que la mayor presencia de esta proteína se ha localizado en los pies perivasculares de los astrocitos cercanos a la zona dañada y en la *glia limitans* a las 48 horas del episodio isquémico. Estos cambios sugieren que la mayor expresión de AQP4 podría facilitar el drenaje del edema a través del SAS [131].

Por todo ello, la participación de AQP4 en la fisiopatología del edema cerebral parece ser más compleja que la del resto de acuaporinas cerebrales, ya que el efecto neuroprotector por ausencia de AQP4 va más allá de la simple disminución del edema cerebral, y es por lo que se le ha asociado una doble función:

- Una función perniciosa al facilitar el desarrollo del edema
- Una función beneficiosa por participar en la resolución del edema y eliminación del agua.

### **Hidrocefalia**

La hidrocefalia es una condición patológica caracterizada por la acumulación de CSF en los ventrículos cerebrales que conlleva, normalmente, a un aumento en la IVP, y es consecuencia de un desequilibrio entre la formación y/o drenaje del CSF, o alteraciones de la circulación del mismo. La hidrocefalia se asocia con una importante morbilidad neurológica, y si no se trata puede provocar inflamación cerebral, discapacidad mental, convulsiones e incluso la muerte. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia media de hidrocefalia es de 85 casos cada 100.000 habitantes, destacando especialmente los datos en pediatría (101/100.000) y en la población anciana (175/100.000) [132,133].

Las hidrocefalias se pueden clasificar en función de dos criterios principales:

❖ Tipo de hidrocefalia que se desarrolla:

- Hidrocefalia comunicante. Se denomina así porque el CSF circula sin obstáculos a través de todo el sistema ventricular, y el bloqueo en el flujo se produce en la salida del circuito, en los SAS en las regiones basales del encéfalo o en las propias vellosidades aracnoideas.
- Hidrocefalia obstructiva (o no comunicante). Tiene lugar cuando existe una obstrucción del flujo del CSF entre el sistema ventricular y los SAS. Según el lugar de la obstrucción se denominan univentricular (Foramen de Monro), biventricular (ambos forámenes de Monro o en tercer ventrículo), triventricular (Acueducto de Silvio o en cuarto ventrículo) y tetraventricular o panventricular (Forámenes de Luschka y Magendie).
- Hidrocefalia *ex vacuo*. Se produce como consecuencia de una atrofia en el parénquima cerebral, como ocurre en las demencias, trastornos psiquiátricos y traumatismos cerebrales.
- Hidrocefalia normotensiva del adulto o iNPH (del inglés *idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus*). Es un tipo particular de hidrocefalia asociado con ventriculomegalia, IVP ligeramente elevada y manifestaciones clínicas características (Tríada de Hakim), que son: demencia, ataxia de la marcha e incontinencia urinaria. Su prevalencia aumenta con la edad, y puede tratarse con éxito mediante derivaciones para el drenaje de CSF, aunque su mejoría clínica disminuye con los años. Como su propio nombre indica, es de etiología desconocida, aunque una disminución en la capacidad de absorción del CSF o de la distensibilidad del sistema ventricular, parece que pueden desempeñar un papel en su patogénesis.

❖ Causa de su desarrollo:

- Hidrocefalia congénita. Se da en infantes y en niños pequeños. La causa más común es por estenosis del acueducto de Silvio, impidiendo parcial o totalmente el flujo de CSF entre el tercer y cuarto ventrículo. Otras causas pueden ser por infecciones o traumatismos durante el desarrollo fetal o por teratógenos. Dado que los huesos del cráneo aún no se han fusionado se observan fontanelas abultadas, así como un aumento notable en la circunferencia de la cabeza, debido a la presión ejercida por el CSF acumulado.

Por lo general, cursan con discapacidad intelectual y déficit de atención, así como defectos de coordinación motora y visual.

- Hidrocefalia adquirida. Se desarrolla después del nacimiento como resultado de traumatismos craneales, tumores o quistes cerebrales, hemorragias intracraneales (subaracnoidea o intraparenquimal) o infecciones del CNS como meningitis o toxoplasmosis.

Se ha estudiado el papel que desarrollan las acuaporinas cerebrales en distintos modelos de experimentales de hidrocefalia. Mao et al. mostraron un incremento significativo de mRNA de AQP4 en hipocampo y corteza parietal de ratas a las que se les indujo una hidrocefalia aguda secundaria por inyección de caolina en cisterna magna [134]. En otro modelo de hidrocefalia comunicante secundaria por inflamación de las membranas aracnoideas por inyección intraparenquimal de estearoil L- $\alpha$ -lisofosfatidilcolina, se registró un aumento en la expresión de AQP4 tanto en los pies como en toda la membrana del astrocito [135]. Estos hallazgos parecían mostrar un papel compensatorio de AQP4 como medida de adaptación fisiológica para facilitar la eliminación del exceso de CSF en hidrocefalia. En esta línea, estudios realizados por Bloch et al. mostraban que la hidrocefalia inducida por caolina progresaba más rápidamente en ratones AQP4<sup>-/-</sup> que en los ratones control, con un mayor grado de ventriculomegalia y elevación de la IVP [136]. Respecto al papel de AQP1, en modelos de hidrocefalia inducida por caolina en ratas se ha observado una disminución de los niveles de mRNA de AQP1 [137]. Otros estudios realizados en ratones, han reportado una importante redistribución de AQP1 en forma de vesículas intracelulares desde el epitelio coroidal, tras inducir hidrocefalia con caolina, lo que los autores atribuyen a un mecanismo compensatorio para disminuir la producción de CSF y reducir el aumento de la IVP. En la misma línea, se encontró que los ratones AQP1<sup>-/-</sup> presentaban un grado de dilatación ventricular menor tras la inyección de caolina que los controles wt, lo que apoyaba la participación de AQP1 en la fisiopatología de la hidrocefalia [138].

Por otro lado, se ha reportado que un 9,6% de los ratones AQP4<sup>-/-</sup> experimentan una hidrocefalia espontánea por estenosis del acueducto de Silvio que se desarrolla entre las primeras 3-4 semanas de edad. Esto lleva a que el CSF quede acumulado en las regiones anteriores (hidrocefalia triventricular) con la consecuente ventriculomegalia y aumento de la IVP, desembocando finalmente en la muerte a las 6 semanas de vida [139]. Por ello, se ha relacionado a AQP4 con el origen de algunas hidrocefalias congénitas en ratones, ya que según

las observaciones de Feng et al., aquellos ratones AQP4<sup>-/-</sup> que desarrollan hidrocefalia por estenosis del acueducto de Silvio muestran una marcada desorganización de la membrana endimaria, en comparación con ratones wt. De forma similar, otros modelos de hidrocefalia congénita, como los ratones *hyh* (del inglés, *hydrocephalus with hop gait*), han revelado que cambios en el patrón de expresión de AQP4 y otras proteínas (conexina-43 y N-cadherina) se relacionan con la incorrecta formación del epéndima [140]. En modelos de rata con hidrocefalia congénita se ha observado una menor expresión de AQP1 en CP en los primeros días postnatales (p5 y p10) respecto a ratas control, que contrasta con la mayor localización identificada de AQP4 en astrocitos corticales y subpiales. La modulación de la expresión de AQP1 y AQP4 parece mostrar un mecanismo compensatorio frente a la hidrocefalia para reducir los efectos perjudiciales de una elevada IVP y de la acumulación de líquido en el espacio ventricular, tanto por una disminución en la producción de CSF como por facilitar la absorción del exceso de agua [141].

### **Otras patologías neurológicas**

Está bien establecido que las barreras vasculares del CNS restringen el tráfico de moléculas dentro y fuera del cerebro y, a pesar de ello, hay una rápida eliminación de productos de desecho metabólico. Recientemente, se ha reconocido la importancia en la circulación e intercambio de solutos entre el CSF – ISF de una vía de transporte “pseudo-linfático”. Este sistema glinfático actúa como una ruta para la recirculación de macromoléculas, donde AQP4 juega un papel fundamental, por su expresión en astrocitos perivasculares, al facilitar la entrada de CSF en el parénquima cerebral a través de espacios para-arteriales, generando un flujo intersticial que elimina dichas macromoléculas a través de espacios para-venosos, y a través de los ganglios linfáticos meníngeos [142]. Diversas enfermedades neurodegenerativas están asociadas con la acumulación y agregación de proteínas por desequilibrios en la dinámica de fluidos en el parénquima cerebral. Por ejemplo, se ha descubierto que a través de esta vía glinfática se elimina el  $\beta$ -amiloide, un péptido que es componente principal de las placas seniles presentes en la enfermedad de Alzheimer (AD). Por ello, un defecto en el flujo del sistema glinfático precederá a la acumulación de depósitos de  $\beta$ -amiloide y a la progresión de la AD. Así, en experimentos realizados en ratones AQP4<sup>-/-</sup> se observó una reducción de  $\approx 70\%$  de flujo de CSF por vía glinfática, con la consiguiente disminución en el aclaramiento de  $\beta$ -amilode ( $\approx 55\%$  menor), lo que sugiere la participación de AQP4 en enfermedades neurodegenerativas como la AD [143]. Además, se ha visto que con el

envejecimiento se produce un fallo en el transporte glinfático, contribuyendo a la acumulación de desechos metabólicos en el cerebro, entre ellos el  $\beta$ -amiloide, y se ha asociado a la pérdida de la localización en astrocitos perivasculares de AQP4 observada en cerebros envejecidos [144].

Por otro lado, se ha sugerido que AQP4 puede tener un papel relevante en el desarrollo de las convulsiones epilépticas. Se ha mostrado que AQP4 se asocia a los canales Kir4.1. en la membrana de los astrocitos. Estos son canales iónicos que participan en el mantenimiento de concentraciones estables de  $K^+$  en el líquido extracelular, facilitando una correcta excitabilidad neuronal. Trabajos experimentales con ratones AQP4<sup>-/-</sup> han mostrado que la ausencia de AQP4 aumenta la frecuencia de episodios epilépticos, lo que se ha relacionado con un defecto en la regulación de los niveles extracelulares de iones  $K^+$ . Esto parece involucrar a AQP4 en el control y susceptibilidad de las crisis comiciales, ya que, además, en pacientes con epilepsia se ha reportado una distribución alterada de AQP4 [145].



## **OBJETIVOS**

---





## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido obtener una mayor comprensión de la participación funcional de las principales acuaporinas cerebrales, AQP1 y AQP4, en la homeostasis del CSF, incluyendo su formación y drenaje. Consideramos igualmente importante explorar los cambios de expresión de estas acuaporinas en el cerebro de ratones jóvenes y viejos sometidos a hipoxia (Hx), y su posible contribución en el desarrollo de la hidrocefalia asociada al envejecimiento. Para ello, se abordaron de forma específica los objetivos a continuación enumerados:

1. Analizar los niveles de expresión de AQP1 y AQP4 en distintas regiones cerebrales asociadas a la homeostasis del CSF en ratones, así como determinar los posibles cambios de expresión compensatorios en los modelos murinos por ausencia de acuaporinas cerebrales (AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> y doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>).
2. Desarrollo de un método de análisis para el estudio del volumen del sistema ventricular cerebral, y para la cuantificación de la presión intraventricular en ratones.
3. Estudiar la dinámica del drenaje del CSF, así como desarrollar un sistema de análisis de la distensibilidad del sistema ventricular cerebral en el modelo murino.
4. Determinar la contribución específica de AQP1 y AQP4 a factores fundamentales en la homeostasis del CSF como son, el volumen de CSF en los ventrículos cerebrales, la presión intraventricular, la dinámica de drenaje del CSF y la distensibilidad del sistema ventricular cerebral.

5. Analizar la regulación en la expresión de AQP1 y AQP4 por Hx y/o envejecimiento.
6. Investigar el efecto que tiene la regulación de AQP1 y AQP4 por la Hx y/o envejecimiento sobre los factores determinantes de la homeostasis del CSF anteriormente mencionados.
7. Evaluar si la hidrocefalia inducida por Hx y/o envejecimiento produce alteraciones cognitivas en el modelo murino, así como la contribución de AQP1 y AQP4 a dicho proceso.
8. Estudiar el grado de reversibilidad de las alteraciones fisiológicas inducidas por la Hx tras la eliminación de dicho estímulo.

## **RESULTADOS**

---



# RESULTADOS

## 1. PAPEL DE AQP1 Y AQP4 EN LA HOMEOSTASIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

### 1.1. Resumen de los resultados

Con idea de conocer la contribución específica y en qué medida participan las principales acuaporinas cerebrales, AQP1 y AQP4, en la homeostasis del CSF, llevamos a cabo en el laboratorio un estudio en el que analizamos distintos parámetros que afectan de forma fundamental a la homeostasis del CSF en ratones wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> y doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>. Este último fue generado en nuestro laboratorio mediante el cruce de las colonias de ratones AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup>.

Mediante análisis histológico por inmunofluorescencia en los cuatro modelos experimentales, pudimos confirmar la expresión diferencial de AQP1 y AQP4 en distintos tipos celulares, evidenciando que AQP1 sólo se detecta en las células epiteliales del CP [60,146]. AQP4 mostraba unos elevados niveles de expresión asociados a podocitos de astrocitos perivasculares y en células de la barrera ependimaria, en cambio, en CP, los niveles de expresión de esta proteína fueron casi inapreciables. No se observó fenómeno compensatorio en la expresión de AQP1 o AQP4 en los distintos mutantes de acuaporina estudiados, respaldando la idoneidad de estos modelos experimentales para conocer la contribución de estos canales a la homeostasis del CSF. Con este fin, realizamos un análisis comparativo de los volúmenes de los ventrículos cerebrales, mediante MRI de secciones coronales para los cuatro

grupos experimentales, y registros de IVP [76,93], permitiéndonos ambos, conocer de forma indirecta la participación de estas proteínas en la formación del CSF y en el llenado ventricular. El estudio de resonancia reveló que el volumen ventricular de los ratones AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup> era, aproximadamente, un 15% menor respecto a los controles (wt). Fue interesante observar que los ratones doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup> presentaban un efecto aditivo en la disminución del volumen ventricular respecto a los modelos de AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup>, por separado, lo que supone una reducción global de ≈30% respecto del wt. Los estudios de IVP confirmaron que los ratones AQP1<sup>-/-</sup> presentaban registros de presión significativamente inferiores a los ratones control, aproximadamente un 40% menor [76,93]. Una situación similar se pudo observar para los ratones AQP4<sup>-/-</sup>, con una IVP casi un 30% inferior a los ratones controles. Los ratones doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>, en cambio, no presentaron una disminución adicional en el valor de IVP respecto a los dos modelos de AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup> por separado, posiblemente atribuible al reducido tamaño del sistema ventricular existente de partida en estos ratones que no expresan ambas proteínas. Ambos análisis, los estudios de resonancia y de IVP, reflejaron que ambas acuaporinas, tanto AQP1 como AQP4, contribuyen de forma similar al llenado del sistema ventricular cerebral, y por tanto, a la formación del CSF.

De forma paralela, y para conocer en qué medida contribuyen ambas acuaporinas a la evacuación del CSF, se analizaron mediante regresión lineal las pendientes de las líneas que se obtienen al representar las distintas tasas de infusión respecto a las medidas de IVP correspondientes para cada tasa de infusión de CSF en los cuatro grupos experimentales [76,93]. Sólo se detectó una disminución estadísticamente significativa en la capacidad de evacuación de CSF en el ratón doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>. Valores más bajos de evacuación de CSF se observaron en los mutantes de AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup>, tanto a tasas de infusión bajas (0,5 μL/min) como a altas (14 μL/min), pero en ambos grupos experimentales las diferencias no fueron significativas. Para el estudio de la complianza, o capacidad de distensibilidad que tiene el sistema ventricular cerebral para acomodar un exceso de volumen, analizamos los incrementos de presión ( $\Delta P$ ) que se producen en los distintos modelos de ratones tras una infusión de 1,75 μL de líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF) en el ventrículo, a un tiempo muy corto (15 segundos). De forma análoga a la dinámica de evacuación de CSF, los datos obtenidos indican que la ausencia de AQP1 o AQP4 por sí solas no son capaces de alterar la complianza ventricular, sin embargo, si ambas acuaporinas no se expresan, encontramos una clara alteración de la complianza, sugiriendo la participación de AQP1 y AQP4 en ellos.

Estos resultados demuestran que en la formación de CSF participan tanto AQP1 como AQP4. AQP1 en los CP, y AQP4 en glía limitante y membrana ependimaria, contribuyen en la producción de CSF, así como en la regulación de la presión del sistema ventricular. Asimismo, los resultados sugieren que las principales acuaporinas cerebrales, AQP1 y AQP4, pueden modificar la dinámica de evacuación del CSF y la distensibilidad ventricular. Como indican estudios recientes [144,147-149], estas acuaporinas cumplirían funciones similares en humanos, por lo que los conocimientos obtenidos a partir de estos resultados sobre el papel de AQP1 y AQP4 en la homeostasis del CSF en modelos murinos podrían ser aplicados al estudio de diferentes condiciones fisiopatológicas en humanos.

**1.2. Trillo-Contreras, J.L. et al. AQP1 and AQP4 Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis. *Cells* 2019, 8(2), 197.**



Article

# AQP1 and AQP4 Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis

José Luis Trillo-Contreras<sup>1,2,\*</sup>, Juan José Toledo-Aral<sup>1,2,3</sup>, Miriam Echevarría<sup>1,2,\*</sup> and Javier Villadiego<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina de Sevilla-IBiS, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla 41013, Spain; jtrillo@us.es (J.L.T.-C.); juanjo@us.es (J.J.T.-A.)

<sup>2</sup> Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, Sevilla 41009, Spain

<sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid 28029, Spain

\* Correspondence: irusta@us.es (M.E.); fvilladiego@us.es (J.V.); Tel.: +34-955-920-036 (M.E.); +34-955-920-034 (J.V.)

Received: 26 December 2018; Accepted: 21 February 2019; Published: 24 February 2019



**Abstract:** Aquaporin 1 (AQP1), expressed in epithelial cells of the choroid plexus, and aquaporin 4 (AQP4) present in ependymal cells and glia limitans have been proposed to play a significant role in cerebrospinal fluid (CSF) production and homeostasis. However, the specific contribution of each water channel to these functions remains unknown, being a subject of debate during the last years. Here, we analyzed in detail how AQP1 and AQP4 participate in different aspects of the CSF homeostasis such as the load and drainage of ventricles, and further explored if these proteins play a role in the ventricular compliance. To do that, we carried out records of intraventricular pressure and CSF outflow, and evaluated ventricular volume by magnetic resonance imaging in AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup>, double AQP1<sup>-/-</sup>-AQP4<sup>-/-</sup> knock out and wild type mice controls. The analysis performed clearly showed that both AQPs have a significant participation in the CSF production, and additionally revealed that the double AQP1-AQP4 mutation alters the CSF drainage and the ventricular compliance. The data reported here indicate a significant extra-choroidal CSF formation mediated by AQP4, supporting the idea of an important and constant CSF production/absorption process, sustained by efflux/influx of water between brain capillaries and interstitial fluid. Moreover, our results suggest the participation of AQPs in structural functions also related with CSF homeostasis such as the distensibility capacity of the ventricular system.

**Keywords:** aquaporins; AQP1; AQP4; cerebrospinal fluid; astrocytes; choroid plexus; cerebral ventricles

## 1. Introduction

Cerebrospinal fluid (CSF) and interstitial fluid (ISF) are crucial components of the cerebral extracellular fluid, being in dynamic equilibrium and bathing neurons and glial cells. The continuous and strictly regulated interchange between CSF and ISF provides a stable brain volume and fluid content of ions and other solutes for neuronal and glial function [1–3]. CSF is produced by modification of the circulating plasma and fills the brain ventricles and the subarachnoid space. In addition to its mechanical function protecting the central nervous system (CNS), CSF represents a fundamental pathway for waste clearance in neural tissue. According to the “classic view” of CSF homeostasis, CSF is mainly produced by the choroid plexus, circulating unidirectionally through the ventricular system and is drained via arachnoid granulations into the meningeal sinus or via lymphatic vessels of the nasal mucosa after crossing the cribriform plate [1,4]. However, recently acquired knowledge has modified



this “classic view” to a new scenario where: (i) there is an important extra-choroidal production of CSF by fluid interchange between brain capillaries and ISF [5]; (ii) a significant paravascular flow of CSF/ISF could occur in the brain parenchyma [6–9]; and (iii) CSF is largely drained by the meningeal lymphatic system [3,10,11]. Alterations on the CSF homeostasis have been strongly associated with the pathophysiology of different CNS pathologies such as hydrocephalus, cerebral edema or ischemia [2,5,12,13]. Moreover, recent findings suggest that a diminished CSF production or drainage accelerates the decay of brain function during aging or aging-associated neurodegenerative diseases [13–16].

Cerebral aquaporins (AQPs), mainly AQP1 and AQP4, have been proposed to play a relevant function on the CSF and ISF homeostasis. Based on their expression pattern, AQP1 expressed only in the choroid plexus epithelial cells and AQP4 in ependymal cells and glia limitans, including pericapillary astrocyte foot processes, a simplistic view of their function associates AQP1 to CSF production and AQP4 to CSF/ISF exchange and absorption [17,18]. In accord with the classic CSF circulation theory, AQP1<sup>-/-</sup> mice showed decreased CSF production and intraventricular pressure, suggesting a prominent role of the AQP1 on CSF formation [19]. However, a study performed in AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice concluded that water influx to the CSF is mediated by AQP4, and not by AQP1, indicating an important role of AQP4 on CSF formation [20]. This finding supports the so-called “Bulat–Klarica–Oreskovic hypothesis”, which proposes an important and constant CSF formation widely distributed in the brain as consequence of water exchange between brain capillaries and ISF [5]. Furthermore, the description by Iliff et al. of a “glymphatic” system that regulates the CSF/ISF exchange through an AQP4-facilitated paravascular flow between peri-arterial and perivenous exchange [6,8,21] has provided additional evidence about the important role of AQP4 on CSF homeostasis. Even though the exact contribution of AQP4 to the so-called “glymphatic” system is currently under debate [2,22,23], there is a broad consensus about AQP1 and AQP4 being fundamental mediators on the CSF brain fluid regulation. Notwithstanding, the precise contribution of AQP1 and AQP4 to the different aspects of the CSF/ISF homeostasis, such as CSF production and drainage, CSF/ISF exchange or the regulation of the ventricular system, is still unknown.

In this work, we study the specific contribution of the principal cerebral AQPs, AQP1 and AQP4, to fundamental properties of the CSF homeostasis, such as CSF formation and outflow, and distensibility of the ventricular system. To this end, we performed a comparative analysis of total ventricular volume, intraventricular pressure (IVP), CSF outflow rate and ventricular compliance in wild type (wt), AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP1<sup>-/-</sup>-AQP4<sup>-/-</sup> knock out (double-AQP<sup>-/-</sup>KO) mice. The obtained results indicate that AQP4 has an important role on the CSF formation, which is comparable to the choroid plexus AQP1 dependent CSF production. That support a significant extra-choroidal CSF formation as predicted by the “Bulat–Klarica–Oreskovic hypothesis. Moreover, and for the first time remarked, our *in vivo* analysis of the ventricular compliance suggests that lack of AQP1 and AQP4 expression reduces the CSF drainage and the distensibility of the cerebral ventricles.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Animal Care

Male AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup>, double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice and wt littermates were housed at 22 ± 1 °C in a 12 h light/dark cycle, with *ad libitum* access to food and water. Animals were 2–6 months old for all experimental procedures. Both AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> animals had a C57BL/6 genetic background, obtained by more than nine generations of outcrossing. Double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice were generated in our laboratory by crossing the AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice colonies used before [13]. Previously, Song et al. [24] described the generation of a double AQP1/4-KO animal using a similar breeding strategy as used here. The general characterization of double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice is shown in Figure S1. AQP1 and AQP4 mutant alleles were genotyped as previously described [25–27].

For sacrifice, animals received terminal anesthesia, by combination of 100 mg/kg ketamine (Pfizer, New York, NY, USA) and 10 mg/kg xylazine (Bayer, Leverkusen, Germany).

All experiments were carried out in accordance with the European Directive 2010/63/EU and the Spanish RD/53/2013 for the protection of animals used for scientific purposes; and all animal procedures counted with the approval of the Animal Research Committee of the Virgen del Rocío University Hospital (26/01/2017/017; University of Seville, Seville, Spain).

### 2.2 Histological Analyses

Mice were perfused with 50 mL of PBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 50 mL of 4% paraformaldehyde (Sigma) in phosphate buffer solution (PBS). Brains were extracted immediately and fixed at 4 °C with 4% paraformaldehyde in PBS. For the analysis of the choroid plexus, tissue was dissected from the brains under a stereoscopic binocular microscope (SZX16; Olympus, Tokyo, Japan) and immunofluorescence was performed as described before [13]. For brain analysis, tissue was processed and cut in a cryostat as previously described [28,29].

Glial fibrillary acid protein (GFAP), AQP1 and AQP4 immunofluorescence analyses were performed as described previously [13,30], using monoclonal anti-GFAP (1:300; G3893, Sigma), polyclonal AQP1 (1:500; ab15080, Abcam, Cambridge, UK) and polyclonal AQP4 (1:100; AQP41-A,  $\alpha$ -Diagnostic, San Antonio, TX, USA). Anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor488 or anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor568 (1:400; A21202 and A11036, respectively, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used as secondary antibodies. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1:1000; Sigma) was used for the nuclei staining. Tissue sections were mounted with Dako fluorescence mounting medium (Dako, Santa Clara, CA, USA). Confocal images were obtained using a A1R<sup>+</sup> confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

### 2.3 Magnetic Resonance Imaging

Magnetic resonance imaging (MRI) was assessed to estimate the size of the ventricular system. MRI analyses were performed as previously shown, and, to avoid differences related with the brain size, the total ventricular volume was normalized with the total brain volume of each mice analyzed [13]. Briefly, animals were anesthetized using 0.5–2.5% sevoflurane with spontaneous breathing. MRI analyses were carried out using an ICON 1 Tesla system (Bruker, Billerica, MA, USA), with a mouse body radiofrequency coil. Total volume of the ventricular system and the brain were estimated from T2-weighted 3D rapid acquisition with relaxation enhancement sequences of brain coronal sections (repetition time, 95 ms; echo time, 3250 ms; plane resolution, 0.188 mm  $\times$  0.188 mm  $\times$  0.563 mm; thickness, 0.5 mm; rare factor, 8; and 32 slices). All images were analyzed with VIRTUE software (Diagnosoft, Morrisville, NC, USA) and ImageJ 1.45 software (Wayne Rasband, NIH, Bethesda, MD, USA).

### 2.4 Intraventricular Pressure Measurements

IVP was measured using a 34-gauge micropipette (Hamilton, Reno, NV, USA) filled with artificial CSF (aCSF), which was inserted into the lateral ventricle through the cerebral cortex (see Figure 3A) as previously shown [13,19]. The micropipette was coupled to a pressure transducer and communicated with a recording system (Biopac Systems, Goleta, CA, USA). Briefly, animals were anesthetized and immobilized in a stereotaxic device (Stoelting, Wood Dale, IL, USA). The micropipette, with an aCSF (120 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, 18 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM glucose, 1.1 mM CaCl<sub>2</sub>; 7.4 pH) infusion rate of 0.3  $\mu$ L/ min {by a syringe pump (KD Scientific, Holliston, MA, USA)}, was placed in the parietal cortex above the lateral ventricle (from bregma in mm: anteroposterior, -0.2; lateral, +1.0; and ventral, -1.0). When the pipette reached the parietal cortex, the pressure gradually rose. Once the pressure was >50 cm H<sub>2</sub>O, the infusion was stopped and the pipette was slowly advanced. The pressure fell promptly when the micropipette reached the lateral ventricle. Henceforth, IVP was recorded. A detailed example of an in vivo record of IVP, and the procedure used

to infer the CSF outflow and ventricular compliance (see Section 2.5) is shown in Figure S2. IVP values were analyzed using Matlab software (Mathworks, Natic, MA, USA).

### 2.5 Cerebrospinal Fluid Outflow Dynamic and Ventricular Compliance Measurements

Dynamic of the CSF outflow was studied by the constant-rate infusion method reported before [13,19]. Concisely, a 34-gauge micropipette (Hamilton) was positioned in the lateral ventricle as described above. IVP was recorded during the continuous infusion of aCSF into the lateral ventricle (at 0.5, 1.5, 3, 7 and 14  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Each infusion rate was maintained until a stabilized IVP was recorded. That results in a step-wise increase in IVP (see example in Figure S2). The CSF outflow resistance was achieved by linear regression from the infusion rate and IVP (Figure 4A). To normalize the IVP values, the basal IVP value (obtained without aCSF infusion) were subtracted from the IVP values obtained after aCSF infusion at each rate.

Ventricular compliance was estimated by calculating the increase in IVP ( $\Delta\text{P}$ ) produced after 1.75  $\mu\text{L}$  of volume increase. This increment in the ventricular volume was induced by 15 s ( $t_1 - t_0$ ) of aCSF infusion after increase the flow rate from 7 to 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  (see Figure 5A and Figure S2), as described previously [13].

### 2.6 Statistical Analysis

Each experimental group consisted of 7–12 animals; the specific numbers (n) are displayed in each figure legend. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and the statistical test performed is specified in each figure legend. For all the analysis carried out, data were tested for normality (Kolmogorov–Smirnov test) and equal variance. When these properties were confirmed, analysis of variance was carried out with Tukey HSD post hoc analysis for multiple group comparisons. All statistical analyses were conducted by IBM SPSS Statistics for Windows (Version 20) or GraphPad Prism 6 packages.

## 3. Results

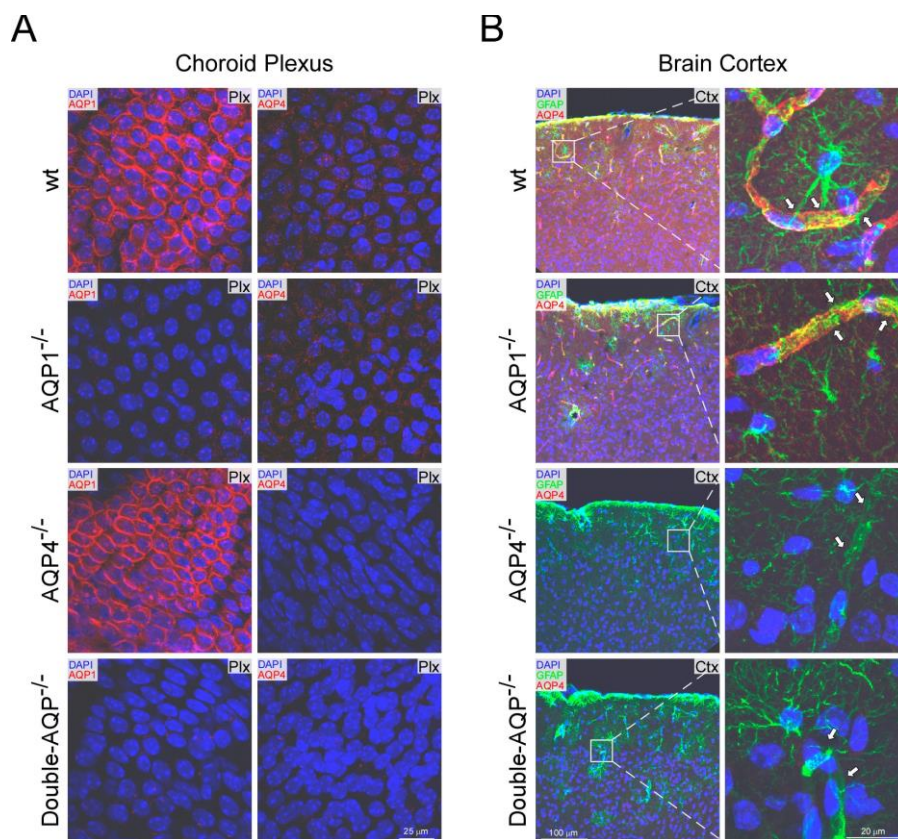
### 3.1 Histological Analyses of AQP1 and AQP4 Expression on the Different AQPs Knock Out Mice

The levels of AQP1 and AQP4 expression were analyzed by immunofluorescence in different brain areas of the four experimental mice models (wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice; Figure 1). As previously stated, expression of AQP1 was only detected in the choroid plexus [18,31]; and similar levels of AQP1 immunostaining were found in the wt and AQP4<sup>-/-</sup> mice (Figure 1A), indicating the absence of any compensatory up-regulation of AQP1 in the choroid plexus from AQP4<sup>-/-</sup> mice. On the other side, as expected, a complete lack of AQP1 expression was observed on the choroid plexus of AQP1<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice.

The analysis of AQP4 revealed, as previously indicated, a significant expression of this protein associated to astroglial and ependymal cells [13,18]. As indicated in Figure 1B, high levels of AQP4 expression were associated to pericapillary foot processes of GFAP<sup>+</sup> astrocytes in both wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice, showing both genotypes similar levels and pattern of AQP4 immunostaining. In addition, the immunofluorescence analysis of AQP4 in the choroid plexus (Figure 1B), confirmed the very low levels of AQP4 protein in this tissue, almost absent, under physiological conditions [13,18]. Moreover, a complete absence of AQP4 expression was found on AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice.

The performed histological analysis confirmed the differential expression pattern of AQP1 and AQP4 in the brain [13,18], showing that AQP1 expression is restricted to epithelial cells of the choroid plexus (Figure 1), without any sign of expression in the cerebral parenchyma (Figure S3). AQP4 is highly expressed in the glia limitans (Figure 1) and ependymal cells of the cerebral parenchyma (Figure S4). However, almost negligible levels of AQP4 protein expression were found in the choroid plexus (Figure 1). In addition, no compensatory regulation of AQP1 or AQP4 in the different analyzed

AQPs mutant was observed, supporting the adequacy of the mice models used to study the specific contribution of AQP1 and AQP4 to the CSF homeostasis.



**Figure 1.** Histological analysis of AQP1 and AQP4 expression in wt and cerebral AQPs KO mice. (A) AQP1 and AQP4 immunofluorescence images from choroid plexus obtained from wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. (B) Immunofluorescence AQP4 and GFAP images obtained from brain coronal sections of wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice, and high magnification images from the insets displayed. The arrows indicate the perivascular foot processes of GFAP<sup>+</sup> astrocytes. GFAP, glial fibrillary acidic protein; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. The images shown are representative examples of three independent animals analyzed for each genotype.

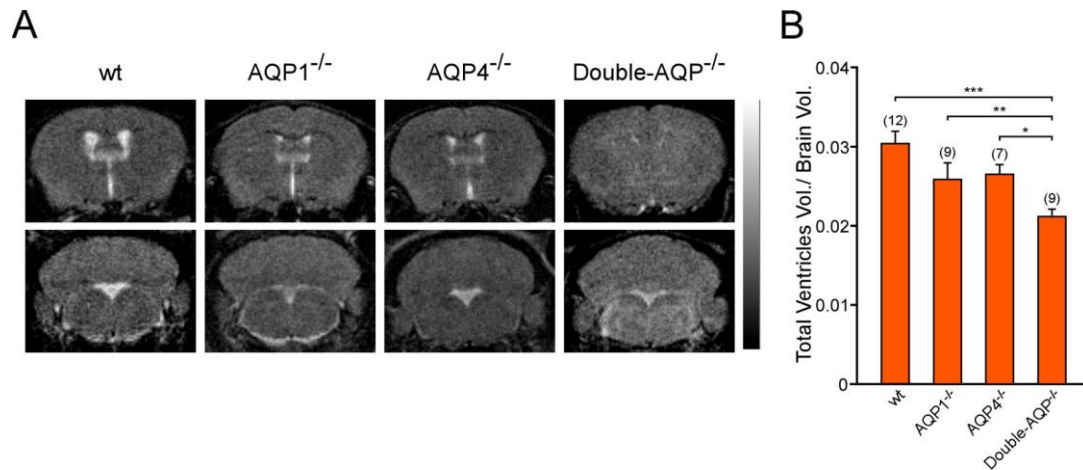
### 3.2 Study of the Volume and Intraventricular Pressure in the Cerebral Ventricular System

To study the specific contribution of AQP1 and AQP4 to the ventricular volume, the volume occupied for the cerebral ventricular system was assessed in wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. Ventricle size was measured from MRI images of brain coronal sections, as an indirect indicator of CSF production, and was represented as the ratio of total ventricular volume/brain volume for all experimental groups (Figure 2A, B). As indicated in Figure 2B, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice showed a slight reduction in the ventricle size with respect to wt controls (~15% smaller in both cases). Moreover, double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice presented an additive decrease in the ventricle size (~30% of reduction with respect to wt controls). Interestingly, the double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice presented diminished ventricle size whether compared with AQP1<sup>-/-</sup> or AQP4<sup>-/-</sup> mice, indicating a similar contribution of AQP1 and AQP4 to the ventricular volume.

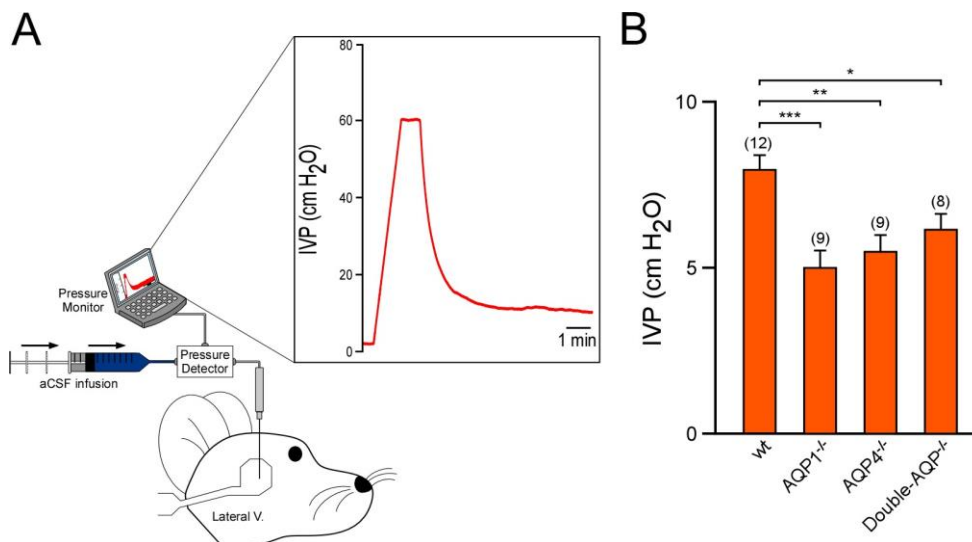
We also analyzed the IVP of the previously described experimental groups (Figure 3). As reported before, by us and other authors, AQP1<sup>-/-</sup> mice showed a significant lower IVP value than wt controls (~40% smaller with respect to wt controls [13,19]). Similarly, AQP4<sup>-/-</sup> mice also exhibited a clear reduction on IVP (~30% reduced with respect to wt controls), confirming the relevant participation of



this protein in the CSF formation and the ventricular volume. Nevertheless, double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice did not present further lower IVP values than AQP1<sup>-/-</sup> or AQP4<sup>-/-</sup>, which can be attributed to the extremely reduced ventricular system existing in these double mutant mice. Taken together, the MRI and IVP analysis performed in the different AQPs mutants clearly showed that both AQP1 and AQP4 contribute similarly to the volume of the brain ventricular system.



**Figure 2.** Analysis by magnetic resonance imaging of the ventricular volume of cerebral AQPs deficient mice. (A) 3D T2-weighted MRI of brain coronal sections from wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. (B) Quantitative analysis of volume of the cerebral ventricular system, stated as the ratio of total ventricular volume/brain volume, for the four experimental groups described in A. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in parenthesis in the figure. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

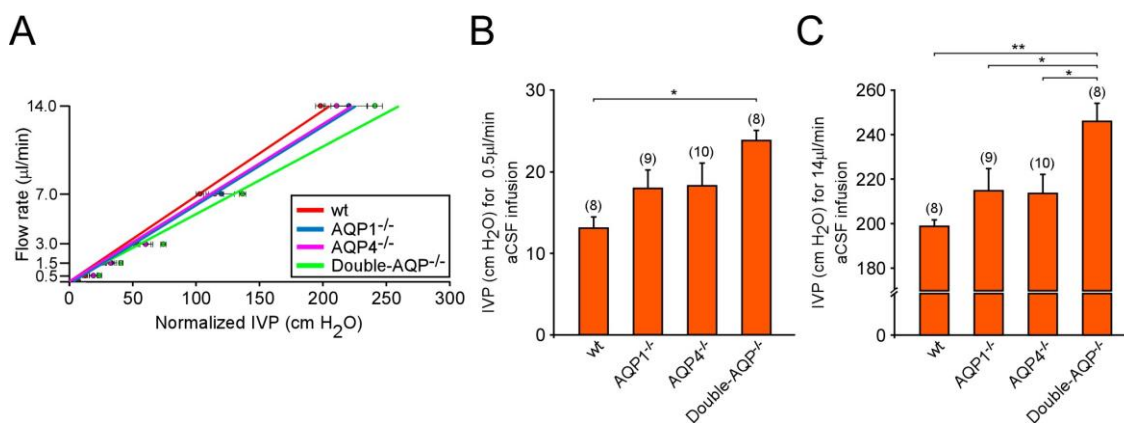


**Figure 3.** Study of the intraventricular pressure of cerebral AQPs knock out mice. (A) Schematic diagram showing the experimental setup used to perform the records of IVP. The graph displayed shows an example of IVP record. Briefly, the micropipette, with aCSF infusion, placed in the parietal cortex above the lateral ventricle produced a peak of pressure. Once the pressure was  $>50$  cm H<sub>2</sub>O, the aCSF infusion was stopped, and the pipette was slowly lowered. The pressure drops promptly when the micropipette entered the lateral ventricle. Hereafter, the IVP was recorded. (B) IVP values obtained from wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in parenthesis in the figure. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

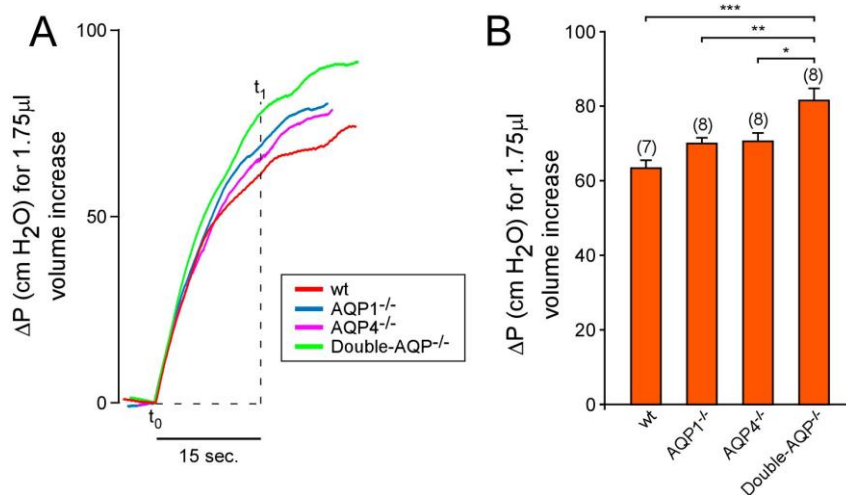
### 3.3 Analysis of CSF outflow and Ventricular Compliance

The participation of AQP1 and AQP4 in the CSF drainage was analyzed by experiments of pressure-dependent CSF outflow performed in wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. In accordance with previously reported data by our group and other authors [13,19], the comparison of the slopes obtained from the linear regression between the CSF infusion rate and the IVP recorded showed no significant differences among wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice (wt: 0.0689; AQP1<sup>-/-</sup>: 0.0609 and AQP4<sup>-/-</sup>: 0.0635; Figure 4A). However, the slope observed in double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice (0.0546) indicated a decreased CSF outflow in these mice with respect to wt controls. To perform a deeper analysis of the CSF drainage, we compared the IVP obtained under low (0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Figure 4B) and high (14  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; Figure 4C) CSF infusion rate in our experimental groups. Some alterations in the capacity to drainage the infused aCSF were observed in AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice, at low or high perfusion rate, although the differences were not statistically significant. However, the double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice showed a significant lower ability to drainage the aCSF in the two analyzed conditions (Figure 4B, C).

We also studied the ability of the cerebral ventricular system to be distended after an increment of the CSF volume, which we called ventricular distensibility or compliance. To do that, we analyzed the increment of pressure ( $\Delta\text{P}$ ) produced in the ventricle after 1.75  $\mu\text{L}$  of aCSF volume increase (Figure 5). Similarly, as explained above for the CSF outflow, the single lack of AQP1 or AQP4 did not significantly alter the ventricular compliance. However, the simultaneous absence of both AQPs showed a significant reduction of the ventricular compliance (Figure 5A, B). Taken together, the reported data indicate that the single AQP1 or AQP4 absence is not enough to alter considerably the CSF outflow dynamics and the ventricular compliance. Nevertheless, the total deficiency of the principal brain AQPs clearly modifies these processes, suggesting the participation of AQP1 and AQP4 on them.



**Figure 4.** Cerebrospinal fluid outflow dynamics in AQPs deficient mice. (A) Pressure-dependent CSF flow rate obtained from wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. Basal IVP values, obtained before starting aCSF infusion, were subtracted from the IVP values obtained after aCSF infusion at each rate (Normalized IVP). (B, C) Comparative analysis of the IVP reached, at steady-state, after the intraventricular infusion of aCSF at 0.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  (B) and 14  $\mu\text{L}/\text{min}$  (C) on the previously described experimental groups. Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in parenthesis in the figure. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 5.** Effect of AQPs absence on the distensibility of the cerebral ventricular system. Representative *in vivo* records of the increment of intraventricular pressure ( $\Delta P$ ) obtained after 1.75  $\mu\text{L}$  of volume increase [produced by 15 seconds ( $t_1 - t_0$ ) of aCSF infusion after increase the flow rate from 7 to 14  $\mu\text{L}/\text{min}$ ] on wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. **(B)** Quantitative analysis of the  $\Delta P$  in the experimental groups described before. The ventricular compliance ( $C$ ) is inversely proportional to  $\Delta P$ : such as  $C = V/\Delta P$ . Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in parenthesis in the figure. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4. Discussion

AQP1 and AQP4 are the principal water-transporter channels in the central nervous system showing a distinct and complementary expression pattern within the brain. Both proteins have been proposed to be principal regulators of the cerebral fluid homeostasis in health as well as pathophysiological conditions. AQP1, exclusively expressed in the apical side of epithelial choroid plexus cells, and AQP4, mainly expressed in astrocytes and ependymal cells [18,32], have been implicated in a recent and intense debate about the CSF/ISF homeostasis. According to the “classic” conception, CSF is mainly produced in the choroid plexus where the water secretion is facilitated by AQP1 [1,4,19] and the fluid circulates unidirectionally into the subarachnoid space to be finally absorbed in the arachnoid granulations toward the dural venous sinuses. However, recent evidence supports an important extra-choroidal CSF formation, where CSF is significantly produced as consequence of water filtration from the brain parenchyma capillaries, being the water movement facilitated by AQP4 [5,20]. In the present work, by *in vivo* analysis performed on wt, AQP1, AQP4 and double-AQP1-AQP4 null mice, we studied the specific contribution of AQP1 and AQP4 to fundamental aspects of CSF homeostasis such as the volume of the ventricles, the CSF outflow dynamics and ventricular compliance. Regarding the CSF production and ventricle load, our MRI and IVP data clearly indicate that both AQPs participate in the CSF formation. Interestingly, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice showed a comparable reduction in the ventricular volume and IVP suggesting that, in terms of CSF production, choroidal-AQP1 and parenchymal-AQP4 have a similar contribution to the CSF formation. In accordance with the participation of both cerebral AQPs in the ventricular volume, double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice displayed lower ventricular volume than single AQP1 or AQP4 mutants. Despite the reduction in the ventricular volume observed in double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice, with respect to AQP1<sup>-/-</sup> or AQP4<sup>-/-</sup> KO mice, these animals present similar IVP values to those observed in the single AQPs KO mutants. These observations suggest a functional coupling between the CSF production, facilitated either by choroidal AQP1 or astroglial and ependymal AQP4, and the ventricular volume to maintain the intracranial pressure under homeostatic values.

The study of the CSF drainage performed by pressure-dependent CSF outflow revealed that single AQP1 or AQP4 mutants do not present significant alterations in the CSF drainage. These results are in accordance with previously reported analysis performed by Verkman's group for AQP1<sup>-/-</sup> mice [19] and our group in the case of AQP4<sup>-/-</sup> mice [13]. However, the results obtained in the double-AQP mutant indicate that both proteins could participate, directly or indirectly, on the CSF outflow dynamics. However additional analysis of the CSF drainage process is necessary to understand it and to identify where and how AQP1 and AQP4 might contribute to it. The potential participation of the cerebral AQPs in the CSF drainage and CSF/ISF interchange has been proposed in experimental model of hydrocephalus [33–36], but the specific mechanism by which these AQPs could facilitate the CSF drainage is still unknown. The recent description of the AQP4-mediated “glymphatic system” and its functional coupling with the meningeal lymphatics [3,6,8,37] have provided additional evidence supporting that cerebral AQPs could participate in the ISF/CSF interchange and drainage.

Regarding the contribution of AQP1 and AQP4 to the ventricular compliance, the data obtained in the double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice suggest, unexpectedly, that cerebral AQPs could regulate the ventricular compliance. The mechanism by which these AQPs could alter the ventricular system distensibility is unidentified at the present time. Additional experimental analysis should be performed to understand if the reduced ventricular volume could be related with this alteration, or if the absence of cerebral AQPs alters the biophysical properties of the cerebral parenchyma; or even if this modification could be associated with systemic alterations that potentially modify the cerebral blood flow, and secondarily alter the cerebral compliance.

In addition to AQP1 and AQP4, the aquaglyceroporin AQP9 is also expressed in the brain, being localized in astrocytes in the glial limitans, endothelial cells of the pial vessels and specific groups of neurons [38,39]. Again, the specific contribution of AQP9 to different aspects of CSF dynamics and its possible alterations on cerebral pathologies is an issue of growing interest [40,41], and might contribute to better understand yet unresolved questions, but should be further addressed with more experimental and clinical studies. In this respect, although most of the knowledge concerning the role of AQP1 and AQP4 on the CSF homeostasis has been obtained in animal models, during recent years, growing studies indicate that these AQPs might have similar functions in humans, and their alterations would be implicated in different pathophysiological conditions [7,15,42,43]. Moreover, in the last years, another AQP, AQP11, has been reported to be expressed in the brain [44,45]. Further experimental work should be performed to address if some of the modifications observed in the double-AQP<sup>-/-</sup> KO could be related with compensation of other AQPs and/or alterations in the brain water content.

In conclusion, our results clearly indicate that glial- and ependymal-expressed AQP4 facilitate the CSF formation, having a quantitatively similar contribution to this process that choroidal-expressed AQP1. The fact that AQP4 facilitates the CSF production is aligned with the recently formulated “Bulat–Klarica–Oreskovic hypothesis” that predicts a significant CSF production by water filtration from the cerebral capillaries. However, the results obtained from the AQP1 mutant mice, by us and others [19], also imply a significant participation of the choroid plexus in the CSF production and IVP, contrasting with previous reports that question the participation of the choroid plexus on the CSF pressure regulation [5]. In addition, the analysis performed on the double AQP1-AQP4 null mice suggests that the principal cerebral AQPs, AQP1 and AQP4, could modify the CSF outflow dynamics and the ventricular compliance. Nevertheless, additional experimental analysis should be performed to determine the specific localization and function of these AQPs in the classic drainage routes and in the recently identified meningeal lymphatics, their relation with other brain AQPs, and how the lack of any of these cerebral AQPs could modify the structural properties of the cerebral parenchyma. All these would permit obtaining a better understanding of the precise mechanism by which the absence of AQP1 and AQP4 expression could modify these processes.



**Supplementary Materials:** The following are available online <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/2/197/s1>, Figure S1: General characterization of double-AQP<sup>-/-</sup> mice. (A) Number of offspring, percentage and survival after birth of double-AQP<sup>-/-</sup> mice (AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>). (B) Weight and brain volume of adults double-AQP<sup>-/-</sup> mice, expressed as mean  $\pm$ s.e.m., Figure S2: Example of the methodology used to perform the IVP records, and to infer the CSF outflow dynamics and ventricular compliance. A 34-gauge micropipette was placed in the parietal cortex above the lateral ventricle with aCSF infusion at 0.3  $\mu$ L/min, which produced a gradual increase of the pressure. Once the pressure was >50 cm H<sub>2</sub>O, the infusion was stopped and the pipette was slowly advanced. The pressure fell promptly when the micropipette reached the lateral ventricle. Then, the IVP was recorded for 10 min (label in green). After that, the CSF outflow resistance was analyzed by the constant-rate infusion method. Briefly, IVP was recorded during the continuous infusion of aCSF into the lateral ventricle (at 0.5, 1.5, 3, 7 and 14  $\mu$ L/min). Each infusion rate was maintained until a stabilized IVP was recorded, which results in a step-wise increase in IVP (label in blue). Finally, the ventricular compliance was estimated by calculating the increase in IVP ( $\Delta$ P) produced after 1.75  $\mu$ L of volume increase (label in red); this increment in the ventricular volume was induced by 15 s ( $t_1 - t_0$ ) of aCSF infusion after increase the flow rate from 7 to 14  $\mu$ L/min, Figure S3: Absence of AQP1 expression in brain parenchyma. Immunofluorescence AQP1 and GFAP images of the brain cortex, obtained from brain coronal sections of wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice, illustrating the lack of AQP1 expression in the cerebral parenchyma. GFAP: glial fibrillary acidic protein. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole. The images shown are representative examples of three independent animals analyzed for each genotype, Figure S4: AQP4 expression in lateral ventricles. Immunofluorescence AQP4 and GFAP images of the lateral ventricles, obtained from brain coronal sections of wt, AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> and double-AQP<sup>-/-</sup> KO mice. GFAP: glial fibrillary acidic protein. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole. The images shown are representative examples of three independent animals analyzed for each genotype.

**Author Contributions:** Conceptualization and supervision, M.E. and J.V.; Methodology and Investigation, J.L.T.-C., J.J.T.-A., M.E. and J.V.; Formal analysis, J.L.T.-C.; Funding acquisition, J.J.T.-A., M.E. and J.V.; and Manuscript writing, M.E. and J.V.

**Funding:** This work was supported by grants PI12/01882 (M.E.) and PI16/00493 (M.E. and J.V.) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, co-financed by the Carlos III Health Institute (ISCIII) and European Regional Development Fund (FEDER). J.L.T.-C. was partially supported by the Regional Government of Andalusia and FEDER funds through a program for recruitment of young researchers.

**Acknowledgments:** We thank to R. García-Swinburn for critically reading the manuscript, and N. Suárez-Luna, R. Ramírez-Lorca and L. Hiraldo-González for excellent technical help in some of the experiments.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Johanson, C.E.; Duncan, J.A., 3rd; Klinge, P.M.; Brinker, T.; Stopa, E.G.; Silverberg, G.D. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res.* **2008**, *5*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Abbott, N.J.; Pizzo, M.E.; Preston, J.E.; Janigro, D.; Thorne, R.G. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: Is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol.* **2018**, *135*, 387–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Da Mesquita, S.; Fu, Z.; Kipnis, J. The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron* **2018**, *100*, 375–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hladky, S.B.; Barrand, M.A. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: Evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* **2014**, *11*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Oreskovic, D.; Rados, M.; Klarica, M. Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics. *Neuroscience* **2017**, *354*, 69–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Iliff, J.J.; Wang, M.; Liao, Y.; Plogg, B.A.; Peng, W.; Gundersen, G.A.; Benveniste, H.; Vates, G.E.; Deane, R.; Goldman, S.A.; et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ringstad, G.; Vatnehol, S.A.S.; Eide, P.K. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain* **2017**, *140*, 2691–2705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Benveniste, H.; Lee, H.; Volkow, N.D. The Glymphatic Pathway: Waste Removal from the CNS via Cerebrospinal Fluid Transport. *Neuroscientist* **2017**, *23*, 454–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Plog, B.A.; Nedergaard, M. The Glymphatic System in Central Nervous System Health and Disease: Past, Present, and Future. *Annu. Rev. Pathol.* **2018**, *13*, 379–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Louveau, A.; Smirnov, I.; Keyes, T.J.; Eccles, J.D.; Rouhani, S.J.; Peske, J.D.; Derecki, N.C.; Castle, D.; Mandell, J.W.; Lee, K.S.; et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **2015**, *523*, 337–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Aspelund, A.; Antila, S.; Proulx, S.T.; Karlsen, T.V.; Karaman, S.; Detmar, M.; Wiig, H.; Alitalo, K. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.* **2015**, *212*, 991–999. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Xiang, J.; Routhe, L.J.; Wilkinson, D.A.; Hua, Y.; Moos, T.; Xi, G.; Keep, R.F. The choroid plexus as a site of damage in hemorrhagic and ischemic stroke and its role in responding to injury. *Fluids Barriers CNS* **2017**, *14*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Trillo-Contreras, J.L.; Ramirez-Lorca, R.; Hiraldo-Gonzalez, L.; Sanchez-Gomar, I.; Galan-Cobo, A.; Suarez-Luna, N.; Sanchez de Rojas-de Pedro, E.; Toledo-Aral, J.J.; Villadiego, J.; Echevarria, M. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 3515–3526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Silverberg, G.; Mayo, M.; Saul, T.; Rubenstein, E.; McGuire, D. Alzheimer's disease, normal-pressure hydrocephalus, and senescent changes in CSF circulatory physiology: A hypothesis. *Lancet Neurol.* **2003**, *2*, 506–511. [[CrossRef](#)]
15. Suzuki, Y.; Nakamura, Y.; Yamada, K.; Igarashi, H.; Kasuga, K.; Yokoyama, Y.; Ikeuchi, T.; Nishizawa, M.; Kwee, I.L.; Nakada, T. Reduced CSF Water Influx in Alzheimer's Disease Supporting the beta-Amyloid Clearance Hypothesis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0123708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tarasoff-Conway, J.M.; Carare, R.O.; Osorio, R.S.; Glodzik, L.; Butler, T.; Fieremans, E.; Axel, L.; Rusinek, H.; Nicholson, C.; Zlokovic, B.V.; et al. Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2015**, *11*, 457–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Amiry-Moghaddam, M.; Ottersen, O.P. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 991–1001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Papadopoulos, M.C.; Verkman, A.S. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 265–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Oshio, K.; Watanabe, H.; Song, Y.; Verkman, A.S.; Manley, G.T. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J.* **2005**, *19*, 76–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Igarashi, H.; Tsujita, M.; Kwee, I.L.; Nakada, T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 17O JJVCPE MRI study in knockout mice. *Neuroreport* **2014**, *25*, 39–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Jessen, N.A.; Munk, A.S.; Lundgaard, I.; Nedergaard, M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem. Res.* **2015**, *40*, 2583–2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Smith, A.J.; Yao, X.; Dix, J.A.; Jin, B.J.; Verkman, A.S. Test of the 'glymphatic' hypothesis demonstrates diffusive and aquaporin-4-independent solute transport in rodent brain parenchyma. *eLife* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Smith, A.J.; Verkman, A.S. The "sglymphatic" mechanism for solute clearance in Alzheimer's disease: Game changer or unproven speculation? *FASEB J.* **2018**, *32*, 543–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Song, Y.; Ma, T.; Matthay, M.A.; Verkman, A.S. Role of aquaporin-4 in airspace-to-capillary water permeability in intact mouse lung measured by a novel gravimetric method. *J. Gen. Physiol.* **2000**, *115*, 17–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Ma, T.; Yang, B.; Gillespie, A.; Carlson, E.J.; Epstein, C.J.; Verkman, A.S. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 4296–4299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Muñoz-Cabello, A.M.; Villadiego, J.; Toledo-Aral, J.J.; López-Barneo, J.; Echevarria, M. AQP1 mediates water transport in the carotid body. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2010**, *459*, 775–783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Galan-Cobo, A.; Ramirez-Lorca, R.; Echevarria, M. Role of aquaporins in cell proliferation: What else beyond water permeability? *Channels (Austin)* **2016**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Villadiego, J.; Labrador-Garrido, A.; Franco, J.M.; Leal-Lasarte, M.; De Genst, E.J.; Dobson, C.M.; Pozo, D.; Toledo-Aral, J.J.; Roodveldt, C. Immunization with alpha-synuclein/Grp94 reshapes peripheral immunity and suppresses microgliosis in a chronic Parkinsonism model. *Glia* **2018**, *66*, 191–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

29. Villadiego, J.; Romo-Madero, S.; Garcia-Swinburn, R.; Suarez-Luna, N.; Bermejo-Navas, A.; Echevarria, M.; Toledo-Aral, J.J. Long-term immunosuppression for CNS mouse xenotransplantation: Effects on nigrostriatal neurodegeneration and neuroprotective carotid body cell therapy. *Xenotransplantation* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Munoz-Manchado, A.B.; Villadiego, J.; Suarez-Luna, N.; Bermejo-Navas, A.; Garrido-Gil, P.; Labandeira-Garcia, J.L.; Echevarria, M.; Lopez-Barneo, J.; Toledo-Aral, J.J. Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34*, 902–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Nielsen, S.; Smith, B.L.; Christensen, E.I.; Agre, P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7275–7279. [[CrossRef](#)]
32. Nagelhus, E.A.; Ottersen, O.P. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 1543–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bloch, O.; Auguste, K.I.; Manley, G.T.; Verkman, A.S. Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2006**, *26*, 1527–1537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Paul, L.; Madan, M.; Rammling, M.; Chigurupati, S.; Chan, S.L.; Pattisapu, J.V. Expression of aquaporin 1 and 4 in a congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* **2011**, *68*, 462–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kalani, M.Y.; Filippidis, A.S.; Rekate, H.L. Hydrocephalus and aquaporins: The role of aquaporin-1. *Acta Neurochir. Suppl.* **2012**, *113*, 51–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Filippidis, A.S.; Kalani, M.Y.; Rekate, H.L. Hydrocephalus and aquaporins: The role of aquaporin-4. *Acta Neurochir. Suppl.* **2012**, *113*, 55–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cao, X.; Xu, H.; Feng, W.; Su, D.; Xiao, M. Deletion of aquaporin-4 aggravates brain pathology after blocking of the meningeal lymphatic drainage. *Brain Res. Bull.* **2018**, *143*, 83–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Badaut, J.; Petit, J.M.; Brunet, J.F.; Magistretti, P.J.; Charriaut-Marlangue, C.; Regli, L. Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: Preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* **2004**, *128*, 27–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Badaut, P.J.; Regli, L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience* **2004**, *129*, 971–981.
40. Badaut, J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience* **2010**, *168*, 1047–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Liu, H.; Yang, M.; Qiu, G.P.; Zhuo, F.; Yu, W.H.; Sun, S.Q.; Xiu, Y. Aquaporin 9 in rat brain after severe traumatic brain injury. *Arq. Neuropsiquiatr.* **2012**, *70*, 214–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Suzuki, Y.; Nakamura, Y.; Yamada, K.; Huber, V.J.; Tsujita, M.; Nakada, T. Aquaporin-4 positron emission tomography imaging of the human brain: First report. *J. Neuroimaging* **2013**, *3*, 219–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zeppenfeld, D.M.; Simon, M.; Haswell, J.D.; D'Abreo, D.; Murchison, C.; Quinn, J.F.; Grafe, M.R.; Woltjer, R.L.; Kaye, J.; Iliff, J.J. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol.* **2017**, *74*, 91–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Koike, S.; Tanaka, Y.; Matsuzaki, T.; Morishita, Y.; Ishibashi, K. Aquaporin-11 (AQP11) Expression in the Mouse Brain. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Xi, T.; Jin, F.; Zhu, Y.; Wang, J.; Tang, L.; Wang, Y.; Liebeskind, D.S.; Scalzo, F.; He, Z. miR-27a-3p protects against blood-brain barrier disruption and brain injury after intracerebral hemorrhage by targeting endothelial aquaporin-11. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 20041–20050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

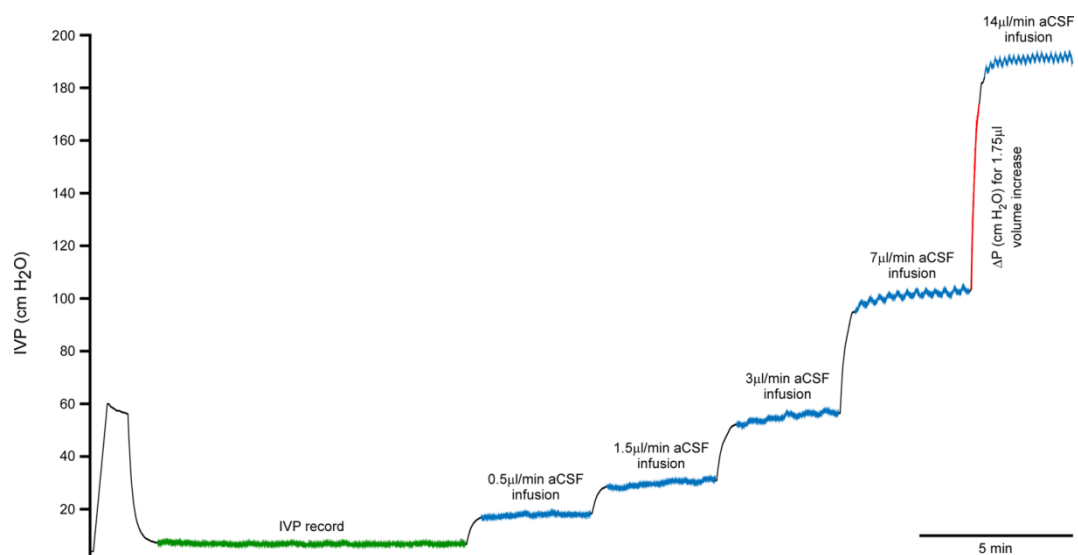
AQP1 and AQP4 Contribution to Cerebrospinal Fluid Homeostasis  
Trillo-Contreras et al., 2019

A

Breeding	Number of offsprings	Double-AQP <sup>-/-</sup> offsprings (frequency, %)	Expected frequency (%)
AQP1 <sup>+/-</sup> :AQP4 <sup>+/-</sup> x AQP1 <sup>+/-</sup> :AQP4 <sup>+/-</sup>	110	5 (4,54%)	6,25%
AQP1 <sup>-/-</sup> :AQP4 <sup>+/-</sup> x AQP1 <sup>+/-</sup> :AQP4 <sup>+/-</sup>	25	3 (12,0%)	12,5%
AQP1 <sup>-/-</sup> :AQP4 <sup>+/-</sup> x AQP1 <sup>-/-</sup> :AQP4 <sup>+/-</sup>	124	33 (26,6%)	25,0%
AQP1 <sup>+/-</sup> :AQP4 <sup>-/-</sup> x AQP1 <sup>+/-</sup> :AQP4 <sup>-/-</sup>	62	14 (22,5%)	25,0%
AQP1 <sup>-/-</sup> :AQP4 <sup>-/-</sup> x AQP1 <sup>-/-</sup> :AQP4 <sup>-/-</sup>	25	10 (40,0%)	50,0%
AQP1 <sup>+/-</sup> :AQP4 <sup>-/-</sup> x AQP1 <sup>-/-</sup> :AQP4 <sup>-/-</sup>	8	5 (62,5%)	50,0%
Survival after birth of Double-AQP <sup>-/-</sup> mice (%)		62 / 70 (88,6%)	

B

Mice Genotype	n	Body Weight (g)	n	Whole Brain Volume (mm <sup>3</sup> )
wildtype (wt)	12	28,0 ± 0,52	12	404,8 ± 7,44
AQP1 <sup>-/-</sup>	10	27,4 ± 0,83	9	384,4 ± 6,03
AQP4 <sup>-/-</sup>	10	26,0 ± 1,13	7	434,7 ± 7,52
Double-AQP <sup>-/-</sup>	11	29,9 ± 0,68	9	434,3 ± 6,47

Figure S1  
Trillo-Contreras et al., 2019Figure S2  
Trillo-Contreras et al., 2019

## Brain Cortex

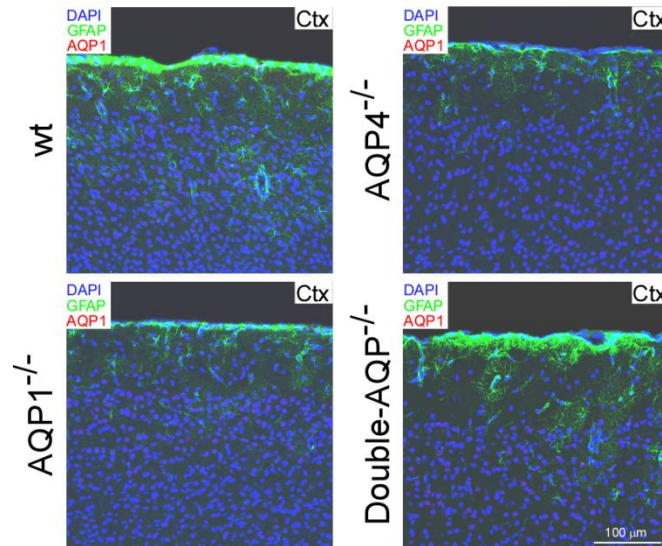


Figure S3  
Trillo-Contreras et al., 2019

## Lateral Ventricle

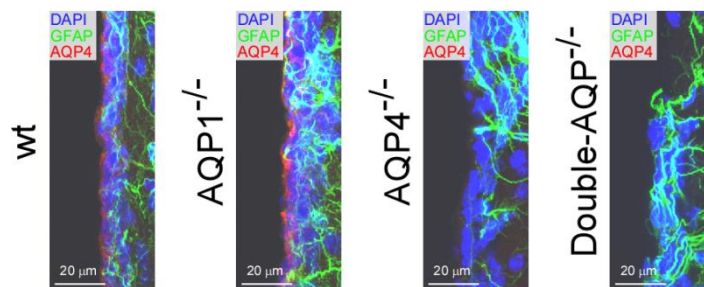


Figure S4  
Trillo-Contreras et al., 2019

## 2. EFECTOS DE LA HIPOXIA Y LA EDAD EN LA HOMEOSTASIS DEL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO: DESARROLLO DE UN MODELO DE MURINO DE HIDROCEFALIA CRÓNICA DEL ADULTO

### 2.1. Resumen de los resultados

Las acuaporinas, al ser canales permeables al agua, intervienen en el movimiento de fluidos entre los distintos compartimentos cerebrales: sangre, CSF, espacio intersticial y líquido intracelular. Derivado de ello, se espera también que participen en la fisiopatología de trastornos cerebrales asociados a desórdenes en la dinámica de fluidos. En condiciones fisiológicas debe haber un equilibrio entre la producción y evacuación de CSF. Alteraciones en la expresión de las acuaporinas asociadas al movimiento cerebral del agua pueden conducir al desarrollo de edema en el parénquima cerebral y a la hidrocefalia. Aunque la relación entre este desorden neurológico y un desequilibrio en la producción, movimiento y evacuación de CSF parecen evidentes [36,77,144,150,151], los mecanismos fisiopatológicos que subyacen esta enfermedad aún son desconocidos. Con este fin, en el presente trabajo, estudiamos los cambios de expresión de las acuaporinas cerebrales en ratones jóvenes (2-4 meses) y viejos (>14 meses) sometidos a tratamiento hipóxico, así como cambios en parámetros fisiológicos tales como: variación en el volumen ventricular, en la IVP, en la evacuación de CSF y distensibilidad del sistema ventricular; y el deterioro cognitivo asociado a dichos cambios.

Por ensayos de inmunohistoquímica y mediante cuantificación densitométrica de los mismos, comprobamos que la expresión de AQP1 era exclusiva al CP y no se modificaba por Hx. AQP4, en cambio, pasó de estar presente de forma muy minoritaria en este tejido, a aumentar significativamente su expresión tras la exposición a Hx. Estudiamos además los cambios de expresión de esta proteína tras tratamiento hipóxico en otras regiones: estriado, corteza y la barrera ependimaria periventricular. No hallamos cambios significativos salvo una pequeña sobreexpresión transitoria asociada a astrocitos corticales, consistente con resultados de otros autores [79]. El mismo estudio en ratones envejecidos reflejó que tras el tratamiento hipóxico, AQP1 no aumentaba su expresión, incluso disminuía ligeramente. Por el contrario, evidenciamos un aumento muy acusado en la expresión de AQP4 con la edad, y observamos que la acción combinada de la edad con la Hx, tanto en CP como en corteza, potenciaba el incremento de expresión de AQP4, asociado a una gliosis, como reflejó el marcaje con GFAP.



Con el objetivo de estudiar si la Hx, a través de cambios en la expresión de las AQP4 cerebrales, pudiera participar en el origen de la hidrocefalia medimos el volumen del sistema ventricular mediante MRI en ratones wt, AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup>, jóvenes y viejos. Los resultados reflejaron que en animales jóvenes se establecía una ligera situación de ventriculomegalia dependiente de AQP4, inducido por la condición hipóxica. En paralelo, otro parámetro fisiológico que analizamos fue la IVP mediante cirugía estereotáxica *in vivo*, y vimos que la ligera ventriculomegalia por Hx no se correspondía con un aumento de presión dentro de los ventrículos. Por su parte, en el animal viejo sometido a tratamiento hipóxico sí fuimos capaces de constatar por resonancia una ventriculomegalia muy significativa, que se acompañaba de un aumento significativo de la IVP. También en el animal viejo, tal como observamos en el joven, estos cambios dependen de AQP4, ya que la ausencia de esta proteína, en el animal AQP4<sup>-/-</sup>, fue capaz de impedir el incremento tanto del volumen ventricular como de la IVP. El análisis de estos resultados demostraba por tanto que es AQP4, y no AQP1, la acuaporina responsable del llenado ventricular que se produce en animales viejos expuestos a Hx.

Llevamos a cabo estudios comportamentales de reconocimiento de objetos a los ratones para identificar si la ventriculomegalia inducida por Hx podía afectar a la función cognitiva, respecto de sus controles normóxicos. Los ratones jóvenes (wt y AQP4<sup>-/-</sup>), tanto en Nx como sometidos a Hx, mostraron una clara atracción por el objeto nuevo, indicando que aquellos animales que no desarrollaban ventriculomegalia, o esta era muy ligera, no veían alterada su capacidad para recordar los objetos antiguos e identificar el nuevo. En cambio, los ratones envejecidos con una ventriculomegalia moderada inducida por Hx crónica no fueron capaces de discriminar correctamente el objeto nuevo del antiguo. Estos resultados sugieren que la alteración cognitiva inducida por Hx en animales viejos, es atribuible al incremento observado tanto en el volumen ventricular como en la IVP. De gran interés y consistente con estos resultados fue encontrar que la ausencia de AQP4 protegió a los ratones viejos de la disfunción cognitiva inducida por Hx crónica.

Sabida la relevancia de la contribución de AQP4 al llenado ventricular en situación hipóxica, estudiamos si la evacuación o drenaje del CSF se veía también afectado con la edad del animal y su exposición a Hx. Así, las pendientes obtenidas de la relación presión-flujo para caudales crecientes de  $\mu$ CSF infundido indicaban la capacidad de drenaje [93]. A medida que la pendiente es menor y la recta se desplaza hacia la derecha, el drenaje es peor, es decir, la IVP alcanzada es mayor para el mismo flujo de  $\mu$ CSF perfundido. No encontramos cambios entre los ratones jóvenes, ni en los wt en Nx e Hx, ni entre los ratones AQP4<sup>-/-</sup> bajo las mismas

condiciones, pero sí observamos una reducción en la capacidad de drenaje de CSF en los animales viejos, que se agravaba cuando se exponían a Hx.

Con un abordaje parecido al test de infusión estudiamos si se modificaba la distensibilidad del sistema ventricular y, de forma similar, no encontramos cambios significativos en ratones jóvenes, pero sí vimos que este parámetro empeora con la edad, y se agrava aún más en combinación con la Hx.

En base a estos resultados, consideramos que estos ratones envejecidos sometidos a Hx pueden ser un buen modelo para el estudio de la hidrocefalia idiopática normotensiva (o hidrocefalia crónica del adulto), como combinación de dos factores:

- Una peor capacidad de drenaje y menor distensibilidad del sistema ventricular que aparece asociado a la edad, y se muestra exacerbado en combinación con la Hx.
- La Hx crónica conlleva a una mayor producción de CSF, probablemente asociado a un aumento del flujo sanguíneo cerebral, y a un aumento y cambio en el patrón de expresión de AQP4 en CP y corteza cerebral, lo que conlleva consigo una importante ventriculomegalia con aumento significativo de la IVP y deterioro cognitivo del animal.

**2.2. Trillo-Contreras, J.L. et al. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. BBA – Molecular Basis of Disease 2018, 1864(10), 3515-3526.**





Contents lists available at ScienceDirect

## BBA - Molecular Basis of Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbadis](http://www.elsevier.com/locate/bbadis)



### Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus



José Luis Trillo-Contreras<sup>a,b</sup>, Reposo Ramírez-Lorca<sup>a,b</sup>, Laura Hiraldo-González<sup>a,b</sup>,  
Ismael Sánchez-Gomar<sup>a</sup>, Ana Galán-Cobo<sup>a</sup>, Nela Suárez-Luna<sup>a,b</sup>, Eva Sánchez de Rojas-de Pedro<sup>a</sup>,  
Juan José Toledo-Aral<sup>a,b,c</sup>, Javier Villadiego<sup>a,b,c,\*</sup>, Miriam Echevarría<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), Virgen del Rocío University Hospital. (HUVR)/Spanish National Research Council (CSIC)/University of Seville, Seville 41013, Spain

<sup>b</sup> Department of Physiology and Biophysics, University of Seville, Seville 41009, Spain

<sup>c</sup> Network Center for Biomedical Research in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Spain

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

AQP4  
Hypoxia  
Aging  
Mice  
Hydrocephalus  
Cerebrospinal fluid

#### ABSTRACT

Aquaporin-4, present in ependymal cells, in glia limiting and abundantly in pericapillary astrocyte foot processes, and aquaporin-1, expressed in choroid plexus epithelial cells, play an important role in cerebrospinal fluid production and may be involved in the pathophysiology of age-dependent hydrocephalus. The finding that brain aquaporins expression is regulated by low oxygen tension led us to investigate how hypoxia and elevated levels of cerebral aquaporins may result in an increase in cerebrospinal fluid production that could be associated with a hydrocephalic condition. Here we have explored, in young and aged mice exposed to hypoxia, whether aquaporin-4 and aquaporin-1 participate in the development of age-related hydrocephalus. Choroid plexus, striatum, cortex and ependymal tissue were analyzed separately both for mRNA and protein levels of aquaporins. Furthermore, parameters such as total ventricular volume, intraventricular pressure, cerebrospinal fluid outflow rate, ventricular compliance and cognitive function were studied in wild type, aquaporin-1 and aquaporin-4 knock-out animals subjected to hypoxia or normoxia. Our data demonstrate that hypoxia is involved in the development of age-related hydrocephalus by a process that depends on aquaporin-4 channels as a main route for cerebrospinal fluid movement. Significant increases in aquaporin-4 expression that occur over the course of animal aging, together with a reduced cerebrospinal fluid outflow rate and ventricular compliance, contribute to produce more severe hydrocephalus related to hypoxic events in aged mice, with a notable impairment in cognitive function. These results indicate that physiological events and/or pathological conditions presenting with cerebral hypoxia/ischemia contribute to the development of chronic adult hydrocephalus.

#### 1. Introduction

Cerebrospinal fluid (CSF) is the main component of the extracellular fluid in the central nervous system (CNS) [1–6]. Apart from its important protective function cushioning the brain and spinal cord against mechanical injury, this fluid represents an important pathway for clearance of waste from neural tissue, and to some extent the delivery of nutrients, hormones and gases [7]. CSF directly communicates with brain interstitial fluid (IF), and in doing so, plays an important role in maintaining the homeostasis of the external fluid bathing glia and neurons. Regulation of brain fluid content (ions and all other solutes) and volume is critical for the normal functioning of the CNS, which is highly sensitive to changes in the osmolarity and hydrostatic pressures

of CSF and IF. In a normal stationary state, there must be an equilibrium between the rates of CSF production and absorption in order to avoid conditions that may trigger hydrocephalus and even parenchymal edema.

It has been suggested that brain aquaporins (AQPs), particularly AQP4 and AQP1, play an important role in CSF homeostasis, and a simplistic view of their functions associates AQP1 with CSF secretion and AQP4 with its absorption [8–11]. Their distribution, with AQP1 expressed in epithelial cells of the choroid plexus [12–15] and AQP4 present in ependymal cells bordering the intraventricular compartments and glia limitans and particularly abundant in pericapillary astrocyte foot processes [8,10,16], provides arguments to propose that both proteins take part in the homeostasis of CSF.

\* Corresponding authors at: Instituto de Biomedicina de Sevilla-IBiS, Avda. Manuel Siurot s/n, 41013 Sevilla, Spain.

E-mail addresses: [fvilladiego@us.es](mailto:fvilladiego@us.es) (J. Villadiego), [irusta@us.es](mailto:irusta@us.es) (M. Echevarría).

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.006>

Received 19 June 2018; Received in revised form 1 August 2018; Accepted 5 August 2018

Available online 08 August 2018

0925-4439/

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Nevertheless, AQP water permeability is associated with general fluid movement among the different brain compartments, namely, blood, CSF and IF, but can also be expected to participate in the pathophysiology of brain fluid disorders. Alterations in the expression of these proteins are associated with the development of brain edema and hydrocephalus. In AQP1-null mice, the lack of AQP1 was associated with a potential beneficial effect on edema produced by a cerebral lesion [14], and kaolin-induced hydrocephalus [17]. Likewise, other studies have suggested an important role for AQP4 in animal models of edema and adult hydrocephalus [8,18–23]. Specifically, for instance, AQP4 participates in the clearance of extracellular brain fluid toward the paravascular space in interstitial edema [24,25]. Further, higher AQP4 expression was observed at the blood-brain barrier (BBB) and blood-CSF interfaces in pharmacologically-induced models of adult hydrocephalus [24,26]. Moreover, AQP4<sup>-/-</sup> mice, developed greater ventriculomegaly and higher intracranial pressure (ICP) after kaolin injection, suggesting an adaptive role of AQP4 to resolve the hydrocephalic situation [27].

Idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH), also commonly called chronic adult hydrocephalus, is a neurological disorder associated with aging characterized by ventriculomegaly and cognitive deficits [28]. Although alterations in CSF production, movement or drainage have been linked with this disorder, the pathophysiological mechanisms underlying this disease are unknown. Apart from the body of evidence that suggests an involvement of cerebral AQPs in CSF homeostasis and adult chronic hydrocephalus, hypoxia has also been associated with the pathophysiology of iNPH [29,30]. In this context, the findings that cerebral AQP expression is altered by hypoxic or ischemic conditions [31–34] and by aging [35], allow us to study how possible modifications of cerebral AQP expression produced by these conditions could alter CSF homeostasis causing or aggravating adult chronic hydrocephalus.

In the present study, we analyzed changes in the expression of brain AQPs in young and aged animals upon hypoxic treatment. We relate such changes to parameters such as total ventricular volume measured by magnetic resonance imaging (MRI), and intraventricular pressure (IVP), CSF outflow rate and ventricular compliance measured by intraventricular recordings in live animals. Here, we demonstrate that hypoxia produces a hydrocephalic condition that could even develop into a considerably more severe hydrocephalus in aged animals, in which upregulation of AQP4 expression is critically involved. An interesting translational finding of our work is that aged mice exposed to chronic hypoxia reproduce the main symptoms of iNPH [36,37], namely, larger ventricles, a slightly elevated intracranial pressure, decreased CSF outflow and ventricular compliance, as well as cognitive deficits. Therefore, chronic hypoxic aged mice appear to be an excellent animal model for studying the pathophysiology, potential diagnostic biomarkers and new treatments for chronic hydrocephalus in adults.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animal care and hypoxic treatments

Male C57BL/6 mice (Charles River), AQP1<sup>-/-</sup>, AQP4<sup>-/-</sup> (kindly provided by Dr. A. Verkman, UCSF, CA) and wildtype (wt) littermates were housed at a controlled temperature (22 ± 1 °C) in a 12 h light/dark cycle, with ad libitum access to food and water. AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice were outcrossed for at least eight generations to obtain a C57BL/6 genetic background. For all experiments, mice were considered young at 2–4 months old, and aged at > 14 months old. The AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice were genotyped as indicated previously for AQP1 [38] and for AQP4 [38]. Mice were maintained either in normal conditions (normoxia) or exposed to hypoxia (2 or 5 days at 10% O<sub>2</sub>) using an hermetically sealed chamber (Coy Laboratory Products, Inc., Grass Lake, MI) with continuous monitoring and control of gas concentrations, temperature and humidity as previously described

[39].

The mice were sacrificed under anesthesia with a combination of 100 mg/kg ketamine (Pfizer) and 10 mg/kg xylazine (Bayer). All experiments were performed in accordance with the European Directive 2010/63/EU and the Spanish RD/53/2013 on the protection of animals used for scientific purposes. The study was approved by the Animal Research Committee of Virgen del Rocío University Hospital (26/01/2017/017; University of Seville).

### 2.2. RNA extraction and quantitative reverse transcription PCR analysis

Cortex and striatum total RNA were isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. For tissues with small amounts of sample as choroid plexus and ependymal with sub-ependymal tissue bordering the lateral and third ventricle, pools of three animals were used. These tissues were micro-dissected in ice-cold PBS under a stereoscopic binocular microscope (Olympus SZX16) from fresh brain coronal sections (thickness 1 mm, using Alto adult mouse brain matrix). Total RNA was isolated using the RNeasy Micro Kit (Qiagen). RNA was only pre-amplified, with an Ambion® WT Expression Kit (Invitrogen), in experiments where too little starting tissue was available, such as those performed with total RNA from old animals, and in the young animals used as their controls. Quantity and purity of RNA were assessed with a NanoDrop ND-1000 UV–vis spectrophotometer (Thermo Fisher), and cDNA synthesis was performed using SuperScript II RNase H<sup>-</sup> reverse transcriptase kits (Invitrogen). Relative mRNA expression levels of the genes studied were quantified using quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis with the ABI PRISM 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems), SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems) and the thermocycler conditions recommended by the manufacturer. Amplification of 18S ribosomal RNA was determined and used to normalize expression levels to compensate for variation in RNA input amounts. Primers were designed using the Primer Express software v2.0 (Applied Biosystems) and its sequences are indicated in the supplementary material (Supplementary Material-1). All samples were analyzed in triplicate.

### 2.3. Histological analyses

Following normoxia or hypoxia treatments, animals were intracardially perfused with 50 ml of 4% paraformaldehyde dissolved in PBS (Sigma). Brains were immediately extracted and processed for cryostat cutting as previously described [39,40]. Coronal sections (30-µm thick) were cut in a cryostat (Leica). Glial fibrillary acid protein (GFAP), AQP1 or AQP4 immunofluorescence was performed as previously described [41] using respectively monoclonal anti-GFAP (1:300; Sigma), polyclonal AQP1 (1:500; Abcam) and polyclonal AQP4 (1:100; α-Diagnostic). Anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor488 or anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor568 (1:400; Invitrogen) were used as secondary antibodies. Nuclei were stained with DAPI (1:1000; Sigma). Tissue sections were mounted with Dako fluorescence mounting medium (Dako). Confocal images were acquired using a Nikon AIR<sup>+</sup> confocal microscope.

Optical density (OD) analysis was performed, for a total of five sections from each animal, covering the parietal cortex. The OD was measured from digitized images using the NIH Image software (ImageJ; NIH) as previously described [42,43].

### 2.4. Western blot analysis

Tissues were dissected from animals, as previously described, and frozen in liquid N<sub>2</sub> for protein extraction. Samples were homogenized in lysis buffer containing 50 mM HEPES, pH 7.3, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% (v/v) NP-40, 5 mM dithiothreitol and 1% (v/v) of a cocktail of protease inhibitors (Sigma) and were left on ice for 5 min.

After centrifugation at 16000g for 15 min at 4 °C, the supernatants were recovered. Lysates were loaded and resolved on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by transfer to a polyvinylidene fluoride membrane (Hybond-P; GE Healthcare, Piscataway, NJ). Membranes were probed with 1:1000 anti-AQP1 (Abcam), 1:250 anti-AQP4 ( $\alpha$ -Diagnostic) or 1:10000 anti-beta Actin (Abcam) antibodies, developed with the ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) and visualized using a Typhoon 9400 imager (Amersham Biosciences).

### 2.5. Magnetic resonance imaging

Magnetic resonance images were taken to assess ventricle sizes as an indirect indicator of CSF production. Mice were anesthetized using 0.5–2.5% sevoflurane with spontaneous breathing. The studies were performed using an ICON 1 Tesla system (Bruker), with a mouse body radiofrequency coil, at the animal facilities of the institute (IBiS). Ventricular volumes were estimated from T2-weighted 3D rapid acquisition with relaxation enhancement sequences of coronal brain sections (repetition time, 95 ms; echo time, 3250 ms; plane resolution,  $0.188 \times 0.188 \times 0.563$  mm; thickness, 0.5 mm; rare factor, 8; and 32 slices). All the images were analyzed with VIRTUE software (Diagnosoft) and ImageJ 1.45 software (Wayne Rasband, National Institute of Health).

### 2.6. Intraventricular pressure measurements

The IVP was measured using a fluid-filled 34-gauge micropipette (Hamilton) inserted into the lateral ventricle through the cerebral cortex as previously described [14]. The micropipette was connected using noncompliant tubing to a pressure transducer (TSD104A; Biopac Systems) interfaced to a recording system (model MP150; Biopac Systems). The circuit also permits artificial CSF (aCSF) infusion by a syringe pump (KD Scientific). Briefly, mice were anesthetized with 100 mg/kg ketamine (Pfizer) and 10 mg/kg xylazine (Bayer) and immobilized, in prone position, in a stereotaxic device (Stoelting). A micropipette, with an aCSF infusion rate of 0.3  $\mu$ l/min, was placed in the parietal cortex above the lateral ventricle (from bregma in mm: anteroposterior,  $-0.2$ ; lateral,  $+1.0$ ; and ventral,  $-1.0$ ). Once the pipette enters the brain parenchyma, the pressure gradually increases and when the pressure was  $> 40$  cm H<sub>2</sub>O, the infusion was stopped and the pipette was slowly advanced. The pressure dropped promptly when the pipette tip reached the lateral ventricle (see Fig. 3C). Then, IVP was continuously monitored and recorded.

### 2.7. Systemic blood pressures measurements

The mean arterial blood pressure, systolic and diastolic blood pressures were monitored by using a blood pressure analysis system for mouse (BP-2000 Series II; Visitech Systems—Physiological Research Instruments).

### 2.8. Cerebrospinal fluid outflow dynamics and ventricular compliance measurements

CSF outflow dynamics were measured by the constant-rate infusion method reported by Oshio et al. [14]. Briefly, a micropipette was located in the lateral ventricle as described before, and IVP was recorded during continuous infusion of aCSF into the lateral ventricle at rates of 0.5, 1.5, 3, 7 and 14  $\mu$ l/min. Each infusion rate was maintained until a steady-state IVP was recorded, resulting in a step-wise increase in IVP (see Fig. 5A). The CSF outflow resistance was obtained by linear regression from the infusion rate and IVP. Ventricular compliance was measured by calculating the increase in IVP produced by the infusion of 1.75  $\mu$ l of aCSF (into the lateral ventricle at rate of 14  $\mu$ l/min).

### 2.9. Novel object recognition testing

Novel object recognition tests were performed in accordance with previously described methods [44]. As indicated in Fig. 4D, a novel object recognition test was performed after the hypoxic treatment (5 days at 10% O<sub>2</sub>). Before start the behavioral test, mice were left for 10 min exploring the box ( $50 \times 50 \times 40$  cm). Then, during the sample trial, mice were placed into the arena with two identical objects and the behavior of the animal was video recorded from a suspended camera. After 10 min, the animal was removed from the arena and placed back into the home cage and the arena was cleaned. After 3 h, the novel object trial was performed. Mice were tested again in the same arena, but with one of the two familiar items randomly replaced with a novel object (with similar discrimination index), and video recorded again for 10 min. The object interactions were analyzed using the Novel Object Recognition Biobserve software (Biobserve GmbH).

### 2.10. Statistical analysis

Each experimental group consisted of 3–12 mice; the specific numbers (n) are shown in each figure. Data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and the statistical test used is indicated in each figure legend. In all cases, the data were tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and equal variance. When these properties were confirmed, analysis of variance was carried out with Bonferroni post hoc analysis for multiple group comparisons, or Student's *t*-test (for two-group comparisons); otherwise, the non-parametric Kruskal–Wallis H test (for multiple comparisons) or Mann–Whitney *U* test (for two group comparisons) were used. All statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.

## 3. Results

### 3.1. Cerebral AQP expression changes in the brain of young mice exposed to hypoxia

Levels of AQP expression in choroid plexus, striatum, cortex and ventricular lining tissue from young wt mice were analyzed after 2 days of hypoxia (10% O<sub>2</sub>) and after chronic hypoxic treatment (5 days at 10% O<sub>2</sub>) and compared to levels observed under normoxic conditions. Expression of AQP1 was only detected in the choroid plexus of young wt animals as previously indicated [10,12]. Although AQP1 mRNA and protein levels were slightly higher after 2 days of hypoxia no significant differences with respect to normoxia were found after any of the hypoxia treatments analyzed (Fig. 1A–D). Levels of AQP1 detected in all other brain tissues studies were negligible, as indicated previously elsewhere [9]. In contrast, AQP4 was widely expressed in tissues including the cortex, striatum and ependymal tissue bordering the lateral and third ventricles (Fig. 1 and Supp. Mat. 2). In the choroid plexus, AQP4 mRNA expression level was very low compared with those found in cortex, striatum and ependymal tissue (Supp. Mat. 1B), being AQP4 protein almost undetectable in normoxic choroid plexus (Fig. 1B,C).

Quantification of AQP4 mRNA levels in the choroid plexus indicated a significant increase of expression after 2 days of hypoxia that correlates with the appearance of AQP4 protein in the choroid plexus after the hypoxic treatments (Fig. 1A–D). In the cortex, a transient induction of AQP4 protein was detected after 2 days of hypoxia (Fig. 1B,E,F) and this could probably be attributed to an earlier overexpression of AQP4 mRNA in cortical astrocytes by hypoxia, as indicated by others authors [45].

On the other hand, after chronic hypoxia (5 days), cortical AQP4 protein levels were lower again (Fig. 1E,F). Such a reduction in AQP4 protein levels could be related to the decrease in the AQP4 mRNA observed after 2 days of hypoxia (Fig. 1A). A detailed analysis of AQP4 expression in the cortex showed, as previously found by single-cell RNA



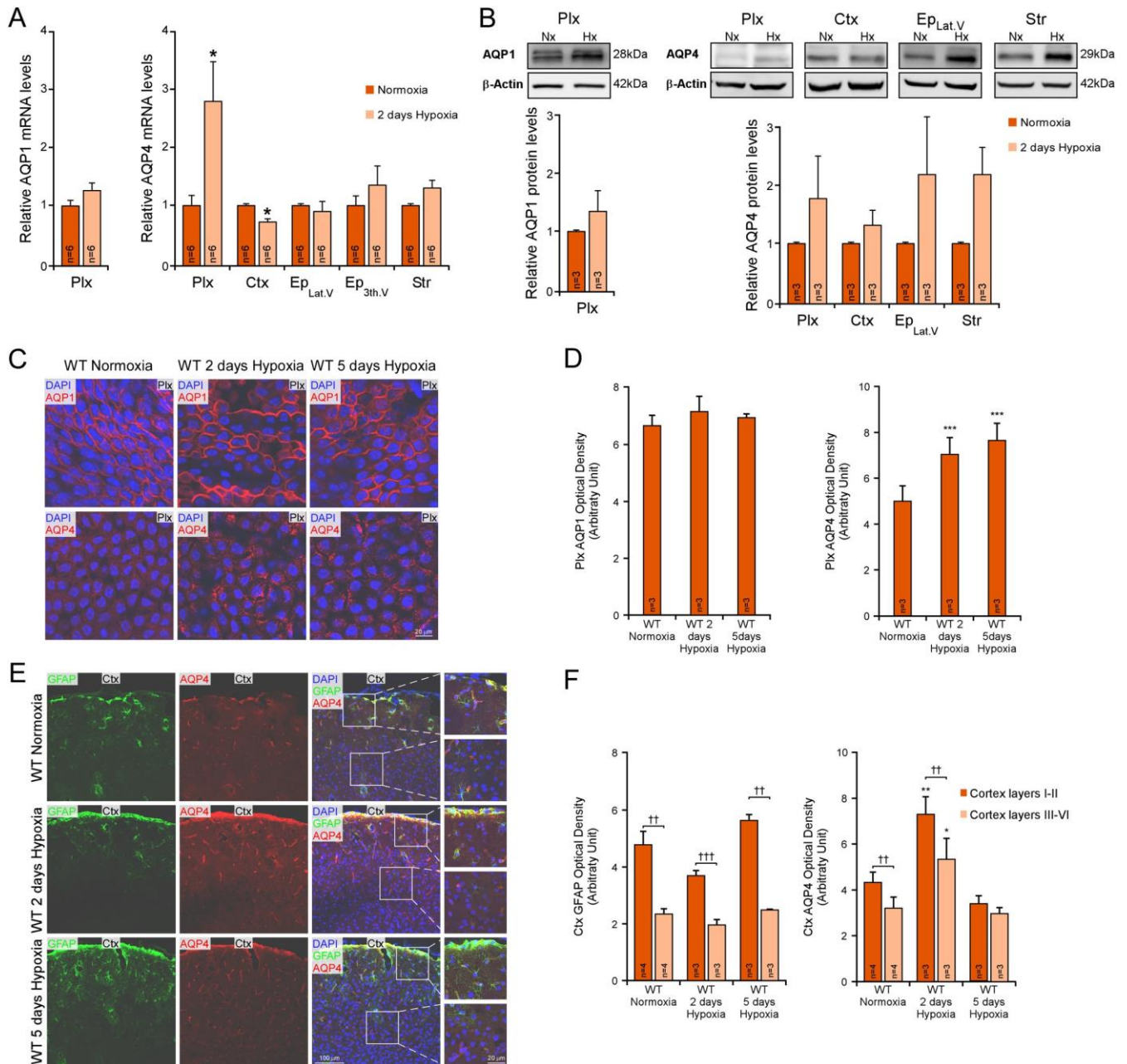


Fig. 1. Brain AQP1 and AQP4 expression in mice exposed to hypoxia.

(A) Expression of AQP mRNA in mice exposed to hypoxia (10% O<sub>2</sub>, 2 days) and normoxic controls was analyzed in the choroid plexus (Plx), cortex (Ctx), tissue lining the lateral (Ep<sub>Lat.V</sub>) and 3rd ventricle (Ep<sub>3th.V</sub>), and striatum (Str). 18S ribosomal RNA was used as housekeeping gene for normalization. (B) AQP1 and AQP4 protein expression, measured by western blot, in the choroid plexus, cortex, ependymal tissue from lateral ventricle and striatum from normoxic controls and mice exposed to hypoxia (10% O<sub>2</sub>; 2 days).  $\beta$ -actin protein level was used for normalization. (C) AQP1 and AQP4 immunofluorescence images of choroid plexus obtained from mice exposed to normoxia or hypoxia (10% O<sub>2</sub>; 2 and 5 days). (D) AQP4 and AQP1 protein expression quantification, by optical density analysis, in the choroid plexus of the experimental groups shown in C. Note that AQP4 expression is notably higher after the hypoxic treatment. (E) Immunofluorescence images of GFAP and AQP4 in brain cortex from the aforementioned experimental groups. The insets show, at higher magnification, the GFAP and AQP4 immunostaining obtained in outer and inner cortex layers. (F) Quantification, by optical density analysis, of the GFAP and AQP4 expression in cortex layers I–II and III–VI in the aforementioned groups. GFAP: glial fibrillary acidic protein. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

In A, B, D and F data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. An unpaired *t*-test was performed for A and B; and analysis of variance with Bonferroni post hoc test for D and F. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in the figure. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001 with respect to normoxic controls. †*p* < 0.05, ††*p* < 0.01, †††*p* < 0.001 differences between cortical layers I–II and III–IV (paired *t*-test).

sequencing [46], that cortical AQP4 expression is mainly associated with astrocytes in the outer layers that have high expression of glial fibrillary acid protein (GFAP<sup>high</sup>).

### 3.2. AQPs expression and their regulation by hypoxia in the brain of aged mice

The expression of brain AQPs was analyzed from two perspectives, examining first the effect of hypoxia in young animals (previously

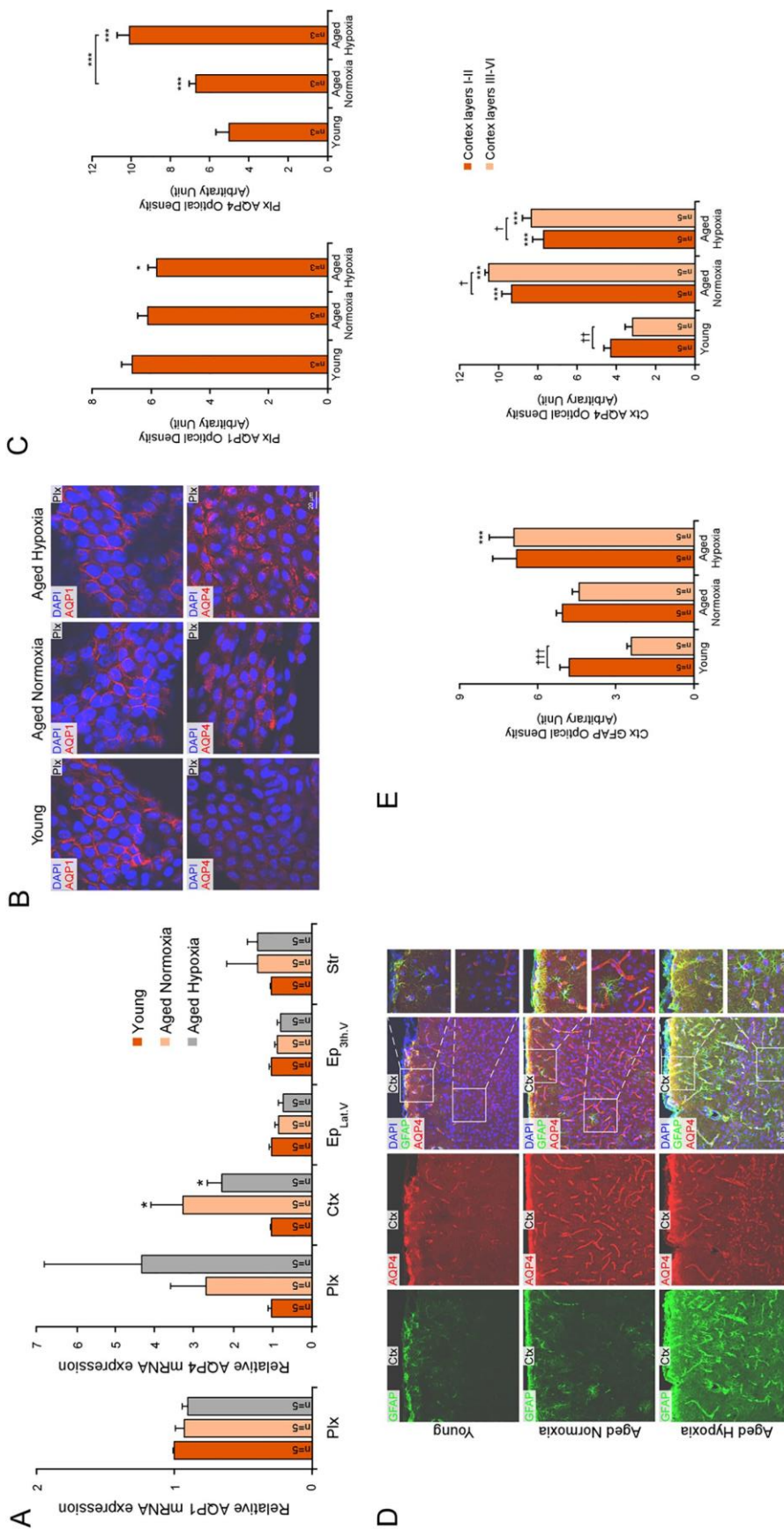


Fig. 2. Effect of aging and hypoxia on brain AQP expression. (A) Expression of AQP mRNA was analyzed in wt young, normoxic aged ( $\geq 14$  months) and hypoxic aged (exposed to 10% O<sub>2</sub>, 5 days). Choroid plexus (Pix), cortex (Ctx), ependymal tissue from lateral ventricle (Epi<sub>Lat.V</sub>) and 3rd ventricle (Epi<sub>3th.V</sub>) and striatum (Str) were analyzed separately for mRNA levels of AQP1 and AQP4 by quantitative real-time PCR analysis. 18S ribosomal RNA was used as housekeeping gene for normalization. (B) Immunofluorescence images for AQP1 and AQP4 of choroid plexus obtained from mice of the aforementioned experimental groups. (C) AQP4 and AQP1 protein expression quantification, by optical density analysis, in the choroid plexus of the experimental groups exposed in B. Note that AQP4 levels is notably higher in the aged mice, both in normoxia and hypoxia, than in the young controls. (D) Immunofluorescence images of GFAP and AQP4 in brain cortex of mice from the same experimental groups indicated in A. The insets show, at higher magnification, the GFAP and AQP4 immunostaining obtained in outer and inner cortex layers. (E) Quantification, by optical density analysis, of the GFAP and AQP4 expression in cortex layers I–II and III–VI in the aforementioned groups. GFAP: glial fibrillary acidic protein. DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

In A, C and E data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Analysis of variance with Tukey HSD post hoc test was performed. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in the figure. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  with respect to young normoxic controls; †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$ , †††  $p < 0.001$  differences between cortical layers I–II and III–VI (paired  $t$ -test).

shown in Fig. 1) and then the regulation associated with aging and chronic hypoxia (Fig. 2 and Supp. Mat. 3). Consistent with our own results presented above, in aged animals, AQP1 expression was only detected in the choroid plexus. Although aging or chronic hypoxia by itself did not significantly affect the expression of this protein in this tissue (Fig. 2A–C), the hypoxic aged mice presented a slight reduction (~10%) of the AQP1 protein levels respect to young normoxic controls (Fig. 2C). By contrast, the analysis of AQP4 expression in the choroid plexus showed that both mRNA (Fig. 2A) and protein (Fig. 2B,C) levels were higher in aged mice, with an undetectable signal in young animals and pronounced signal in aged mice, that was even higher after the hypoxic treatment. Further, the levels of AQP4 mRNA (Fig. 2A) and protein (Fig. 2D,E) in brain cortex were higher in aged animals. Curiously, in aged mice the hypoxic treatment (5 days, 10% O<sub>2</sub>) induced a slight reduction in the expression of both mRNA (Fig. 2A) and protein (Fig. 2E), although their levels remained 2-fold higher than those observed in young animals. Detailed immunofluorescence analysis was performed of GFAP and AQP4 distribution in the brain cortex (Fig. 2D, E). GFAP expression in astrocytes from inner layers was higher in normoxic aged mice than young controls, but the chronic hypoxia treatment slightly increased the GFAP expression in both inner and outer cortical layers. Regarding AQP4, the expression was significantly higher in the aged mice, both in normoxia and hypoxia, across the complete cortical area than in the young animals.

### 3.3. Chronic hypoxia induces slight enlargement of ventricles depending on the presence of AQP4

In order to study how hypoxia might participate in the onset of hydrocephalus, brain ventricle size was compared in wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> young mice maintained in normoxia or chronic hypoxia (10% O<sub>2</sub> for 5 days). Ventricle size was estimated from MRI images of coronal brain sections (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, chronic hypoxia was associated with a slight increase in the total ventricular volume of both wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice. In the case of AQP1<sup>-/-</sup> mice, which had slightly lower ventricular volumes in normoxia, the increase in volume upon hypoxia treatment led to ventricular volumes similar to those observed in the wt hypoxic animals. In contrast, no differences were observed in the total ventricular volume of AQP4<sup>-/-</sup> mice exposed to hypoxia compared to those maintained in normoxia, indicating a key role for AQP4 in the loading of ventricles with CSF that occurs due to hypoxia exposure.

We then measured the effect of chronic hypoxia on the IVP of wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> young mice (Fig. 3C, D). As previously described [14], a significant lower IVP was detected in the AQP1<sup>-/-</sup> mice with respect to the wt mice ( $4.92 \pm 0.7$  and  $4.39 \pm 0.8$  cm H<sub>2</sub>O for the AQP1<sup>-/-</sup> mice in normoxia and hypoxia; vs  $7.90 \pm 0.5$  and  $7.71 \pm 1.1$  cm H<sub>2</sub>O for wt mice in normoxia and hypoxia, respectively;  $p < 0.05$ ; Fig. 3D). Intermediate IVP values were obtained in the AQP4<sup>-/-</sup> mice ( $6.21 \pm 1.0$  and  $6.03 \pm 0.8$  cm H<sub>2</sub>O in normoxia and hypoxia, respectively), indicating a slight reduction (~20%) with respect to the wt mice. Interestingly, as shown in Fig. 3D, hypoxic treatment was not associated with changes in IVP in any of the groups (wt, AQP1<sup>-/-</sup> or AQP4<sup>-/-</sup> mice), indicating that the slight increases in ventricular volume produced by hypoxia in the wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice were not accompanied by variations in IVP. In addition, because CSF is produced by modification of blood plasma, and in order to analyze if the changes observed in the ventricular volume or IVP might be due to alterations in systemic arterial blood pressure caused by the hypoxia and/or the absence of AQPs, arterial blood pressure was monitored in all of the experimental conditions and no differences were found between groups (Supplementary Material 4A).

### 3.4. Chronic hypoxia produces hydrocephalus in aged mice depending on the presence of AQP4

We studied how chronic hypoxia affects ventricular volume in aged mice ( $\geq 14$  months old). As shown in Fig. 4A,B, MRI of coronal brain sections revealed a large increase in the ventricular volume in aged wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice subjected to chronic hypoxia (5 days, 10% O<sub>2</sub>). The quantitative analysis of ventricular volume confirmed the larger ventricle size in hypoxic aged wt and AQP1<sup>-/-</sup> animals (>44% larger than in normoxic controls in both cases), and this was markedly larger than the volume observed in young wt animals exposed to hypoxia (~15% larger than in normoxic controls). Notably, the absence of AQP4 completely abolished the hypoxic ventricle enlargement in aged mice (Fig. 4B). Unlike what occurred in young animals, in aged wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice, exposure to hypoxia produced a moderate but statistically significant increase in IVP (Fig. 4C). In accordance with the MRI data, the lack of AQP4 also blocked the increase in IVP observed in aged wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4C). Again, the changes observed both in the ventricular volume and IVP in the different experimental groups of aged mice cannot be attributed to modifications in the systemic arterial blood pressure (Supplementary Material 4B).

Given the similar response shown by the wt and AQP1<sup>-/-</sup> mice in all measurements performed up to this point and since the analysis of the ventricle volume and IVP clearly indicate that the ventricle CSF overload produced by hypoxia is mediated by AQP4, in the subsequent experiments we only analyzed wt vs AQP4<sup>-/-</sup> mice.

Next, we studied, in wt and AQP4<sup>-/-</sup> mice, whether the ventriculomegaly induced by hypoxia could affect cognitive function. A novel object recognition test was performed in animals subjected to chronic hypoxia and normoxic controls, as outlined in Fig. 4D. In the case of wt young mice, both hypoxic animals and normoxic controls showed a clear preference for the novel object, indicating that the slight increase in the ventricular volume associated with chronic hypoxia did not alter the ability to remember the sample object and identify the new one. Similar results were also obtained on AQP4<sup>-/-</sup> young mice, in both hypoxic and normoxic animals, which are in agreement with the absence of ventriculomegaly induced by chronic hypoxia observed on these AQP4<sup>-/-</sup> animals. In contrast, when the same experimental procedure was applied to aged wt mice, normoxic controls still showed a clear preference for the novel object, but hypoxic animals failed to exhibit any predilection for the new object. This suggests that cognitive deterioration is induced by hypoxia in aged animals, attributable to the increase observed in both total ventricular volume and IVP. Interestingly, and in agreement with the protection against hypoxia-induced hydrocephalus observed in aged AQP4<sup>-/-</sup> mice, the lack of AQP4 also protects the aged animals from cognitive impairment induced by chronic hypoxia (Fig. 4D, bars graph). Taken together, these data clearly indicate that chronic hypoxia induces adult chronic hydrocephalus in aged animals through AQP4, with a moderate increase in IVP, leading to cognitive deterioration.

### 3.5. CSF outflow rate is affected by aging and hypoxia

Given the key participation of AQP4 in the ventricular CSF overload under hypoxia, we also studied, in wt and AQP4<sup>-/-</sup> mice, whether hypoxia and aging were able to modify CSF outflow and ventricular compliance. To that end, pressure-dependent CSF outflow was measured as described elsewhere [14]. As indicated in Fig. 5A, artificial CSF was infused into the lateral ventricles and steady state IVP values were recorded as a function of the CSF perfusion rate. Using this experimental procedure, measurements of CSF outflow were performed in wt and AQP4<sup>-/-</sup> mice (young and aged) exposed to normoxia or hypoxia. Comparison of slopes indicated no significant differences between the pressure-dependent CSF outflow in wt and AQP4<sup>-/-</sup> young mice in normoxia (Fig. 5B); and neither were changes observed in the outflow rates in these animals after the hypoxic treatment (Fig. 5C,D).



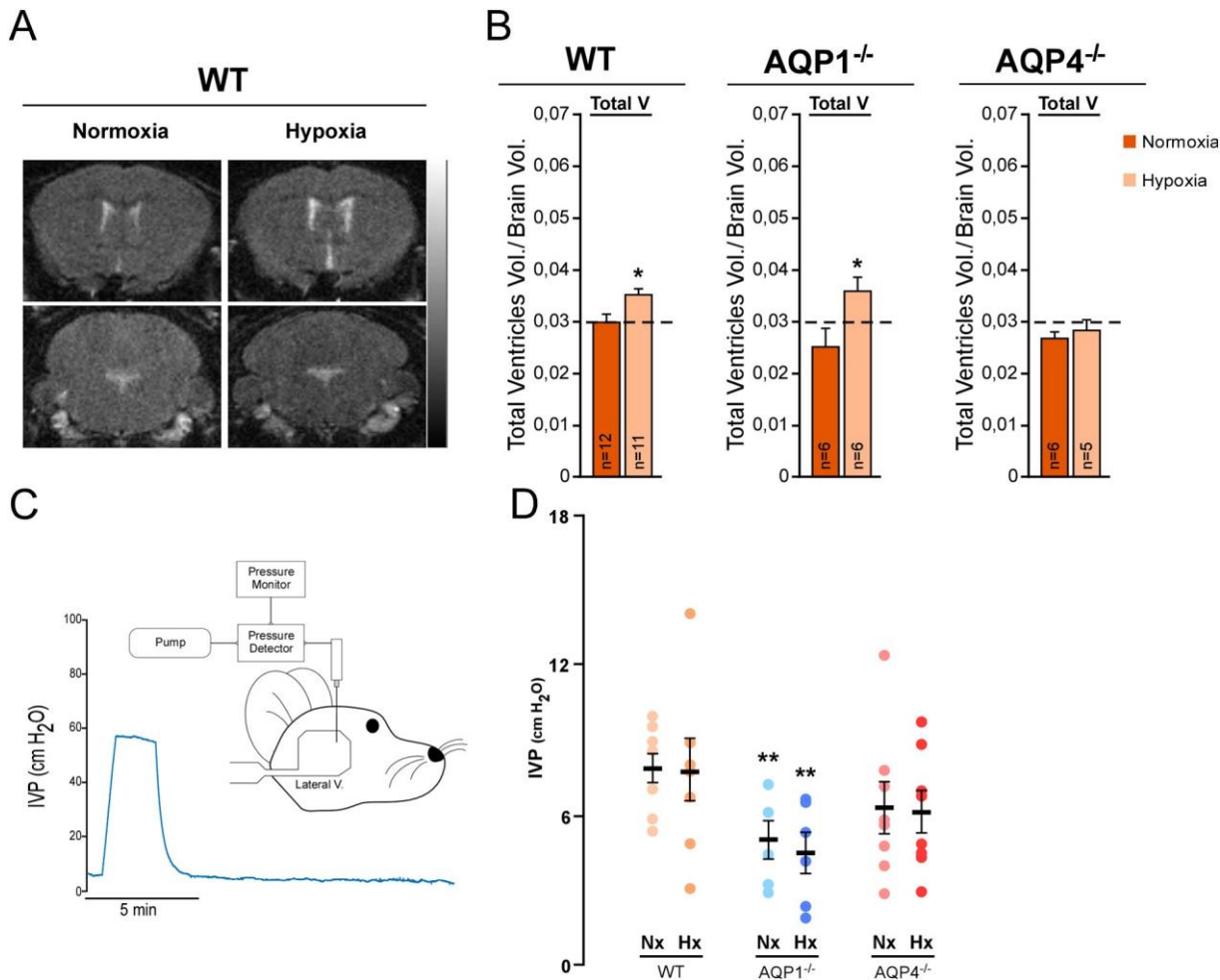


Fig. 3. Magnetic resonance images and intraventricular pressure of young mice exposed to chronic hypoxia. (A) MRI of brain coronal sections of young wt mice exposed to normoxia or chronic hypoxia (10% O<sub>2</sub>, 5 days). (B) Quantification of the ventricular volume from MRI of wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice under the experimental conditions indicated in A. (C) Diagram illustrating the procedure to measure the IVP. (D) Values of IVP in wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice exposed to hypoxia (10% O<sub>2</sub>, 5 days) or kept in normoxia.

In B and D data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. An unpaired *t*-test was performed for B and analysis of variance with Bonferroni post hoc test for D. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in the fig. B,  $p < 0.05$ , with respect to normoxic control mice. D,  $p < *0.01$ , with respect to wt mice.

Conversely, a clear reduction in slope was found in both wt and AQP4<sup>-/-</sup> aged animals compared to young ones, that was even more marked after hypoxia treatment (Fig. 5E–G); this indicates that a significant reduction in pressure-dependent CSF outflow is produced over the course of aging, and that this is exacerbated by chronic hypoxia.

In addition to the analysis of the CSF outflow, ventricular compliance ( $C_v$ ) after the influx of a constant volume (1.75  $\mu$ l) was evaluated in the experimental groups described before ( $C_v = 1.75 \mu\text{l}/\Delta P$ ). The induced increase in pressure ( $\Delta P$ ) was clearly larger in aged animals, and it was significantly amplified under chronic hypoxia (Fig. 5H,I), implying therefore a reduction on  $C_v$ . Similar to the observations concerning CSF outflow, no significant differences were detected in the ventricular compliance between young wt or AQP4<sup>-/-</sup> mice exposed to normoxia or hypoxia (Fig. 5D). In brief, these experiments indicate that aging of animals produces a reduction in CSF outflow and ventricular compliance, which is greater under chronic hypoxia. Interestingly, the analysis performed on wt or AQP4<sup>-/-</sup> mice suggests that the effects of aging and hypoxia on outflow rate and cerebral distensibility are independent of the presence of AQP4 (Fig. 5G,I).

Taken together, the histological and MRI analysis suggest that under chronic hypoxia, the higher levels of AQP4 found in aged brains in the choroid plexus and cortex, both areas associated with CSF generation

[35,47], facilitate the overloading of ventricles with CSF. In addition, measurements of CSF outflow and ventricular compliance indicate that both aging and chronic hypoxia diminish CSF drainage and brain distensibility, contributing to the development of adult chronic hydrocephalus and significant cognitive deficits.

#### 4. Discussion

Given their function and strategic location in tissues limiting the CSF-brain interface, AQPs have been extensively associated with the production and absorption of CSF. Numerous studies in different animal models have indicated that AQP1 and AQP4 contribute to hydrocephalus, a disorder characterized by CSF accumulation in the ventricular system and subarachnoid space [10,16,17,48]. Further, regulation of the expression of cerebral AQPs has been extensively demonstrated by using experimental approaches to produce hypoxia or ischemia including traumatic brain injury and cerebral artery occlusion [49,50], or just exposure of animals to low oxygen tension [33,34,45,51] and by comparing young and aging animals [35]. In the present work, we performed experiments to explore whether there is a link between hypoxia, AQPs and aged-related hydrocephalus, and the evidence supporting this link are discussed.

We analyzed how AQPs modify their expression in response to

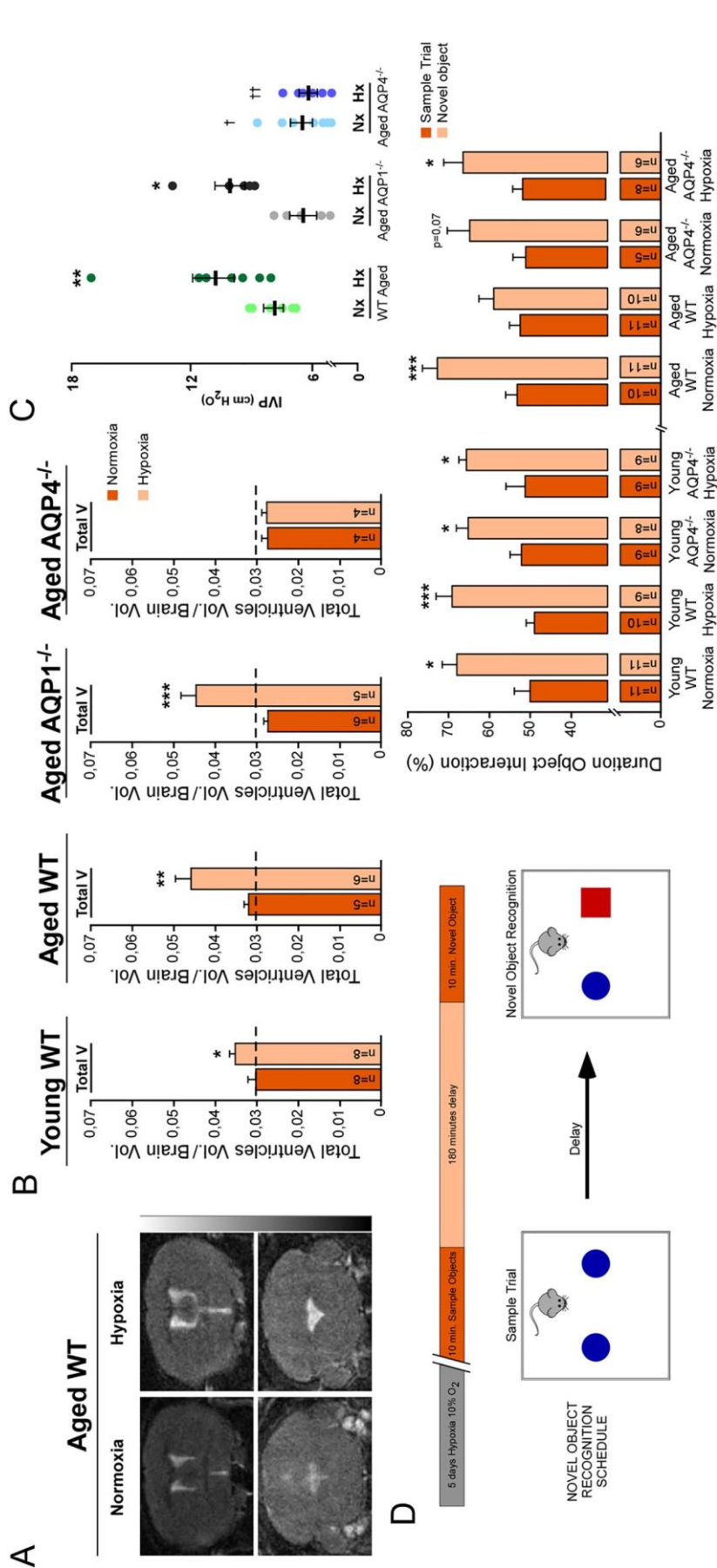


Fig. 4. Ventriculomegaly induced by chronic hypoxia in aged animals. (A) MRI of brain coronal sections of aged wt mice exposed to normoxia or chronic hypoxia (10% O<sub>2</sub>, 5 days). (B) Quantification of the ventricular volume of young wt and aged wt, AQP4<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice under the experimental conditions indicated in A. (C) Values of IVP in aged wt, AQP4<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice, under the aforementioned conditions. (D) Diagram showing the experimental protocol performed to evaluate cognitive function, by novel object recognition, and analysis of the novel object recognition test. Note that in aged mice the hypoxic treatment produces hydrocephalus, manifested by a large increase in the total ventricular volume (which is dependent on the AQP4 expression) with an increase in the IVP and deterioration in cognitive function. In B, C and D data are presented as mean ± S.E.M. An unpaired t-test was performed. The number of animals analyzed per experimental condition is indicated in the figure. B and C, p < 0.05, p < 0.01 with respect to normoxic control mice. †p < 0.05, ††p < 0.01 with respect to wt mice. D, p < 0.001 with respect to the sample object (on the sample trial).



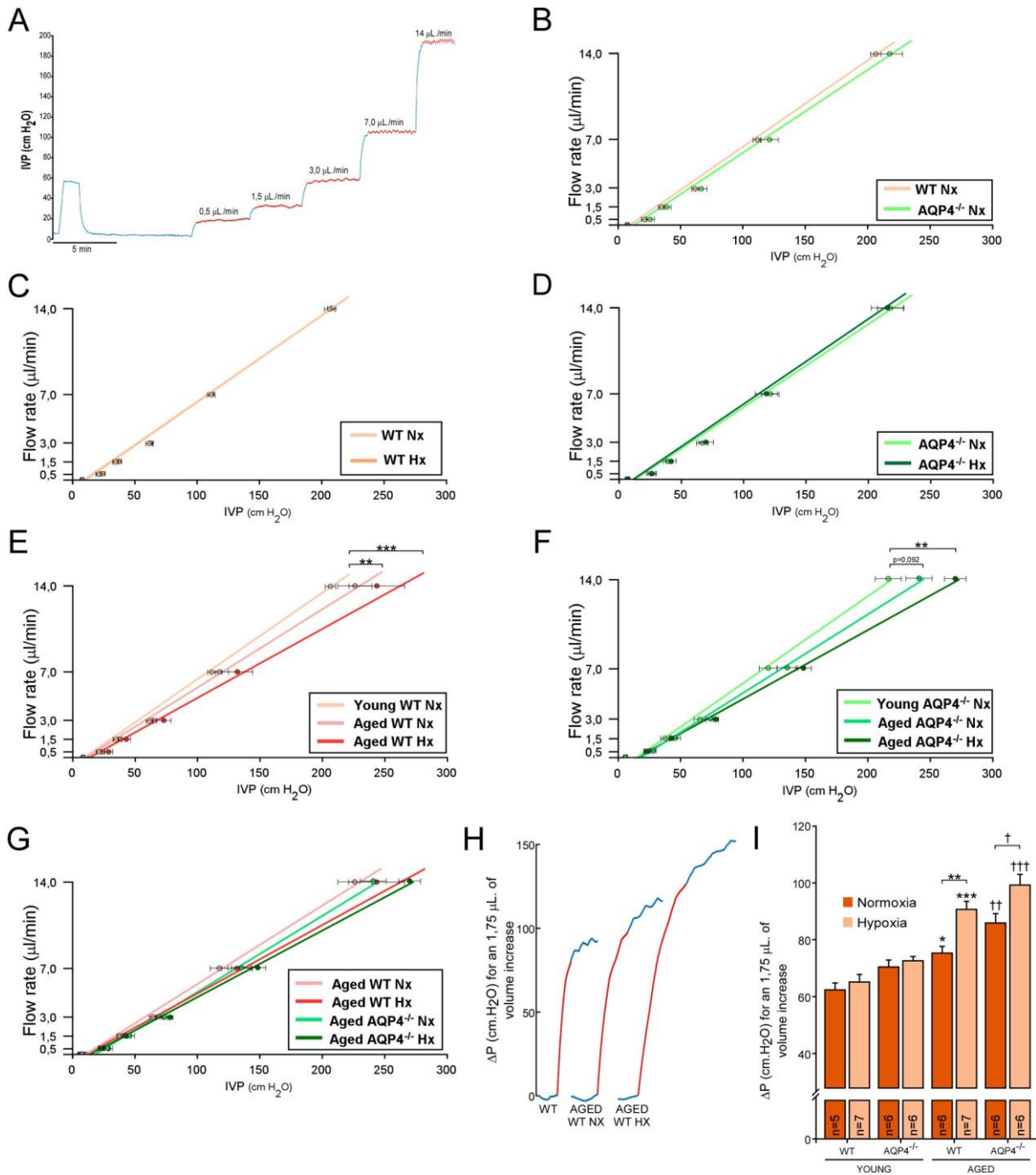


Fig. 5. Measurements of CSF outflow rates and ventricular compliance. (A) Schematic representation of the methodology used to measure outflow rate of CSF. (B-F) Outflow rate measurements were performed in young wt and  $AQP4^{-/-}$  in normoxia (B); young wt (C) and  $AQP4^{-/-}$  (D) in normoxia or chronic hypoxia (10%  $O_2$ ; 5 days); young and aged mice exposed to normoxia or hypoxia (10%  $O_2$ , 5 days; E and F for wt and  $AQP4^{-/-}$  respectively); and comparison between aged wt and  $AQP4^{-/-}$  mice exposed to normoxia or hypoxia (G). Comparison of slopes indicated non-significant differences between the pressure-dependent CSF outflow of experimental groups analyzed in B, but clear reduction in slope in aged mice, compared to young controls, that is even more pronounced in aged hypoxic mice. (H) Diagram outlining the methodology used to analyze the ventricular compliance. (I) Quantitative analysis of the ventricular compliance in wt and  $AQP4^{-/-}$  young and aged mice exposed to normoxia or chronic hypoxia.

In B–G data are presented, for each experimental point, as mean  $\pm$  S.E.M and the linear regression line was extrapolated for each experimental condition. The number of animals analyzed per experimental condition were as follows: B, WT Nx, n = 5;  $AQP4^{-/-}$  Nx, n = 6. C, WT Nx, n = 5; WT Hx, n = 7. D,  $AQP4^{-/-}$  Nx, n = 6;  $AQP4^{-/-}$  Hx, n = 6. E, young WT Nx, n = 5; aged WT Nx, n = 6; aged WT Hx, n = 7. F, n = 6 per experimental group. G, aged WT Nx, n = 6; aged WT Hx, n = 7; aged  $AQP4^{-/-}$  Nx, n = 6; aged  $AQP4^{-/-}$  Hx, n = 6. I: the number of animals analyzed per experimental condition is indicated in the figure. Analysis of variance with Tukey HSD post hoc test \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 with respect to young wt mice. In G data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 with respect to young wt normoxic controls. †p < 0.05, ††p < 0.01 and †††p < 0.001 with respect to young  $AQP4^{-/-}$  normoxic mice

chronic hypoxia and whether increases in ventricular volume, as an indicator of greater production of CSF, were occurring in parallel. In line with the “classical” idea that AQP1 in the choroid plexus plays a major role in the production of CSF [52], we expected that hypoxia would preferentially affect expression of AQP1. But on the contrary, although hypoxia was followed by a slight increase in both AQPs in young animals, the only significant increase observed was in AQP4. In normoxia, AQP1 was the AQP most abundantly expressed in the choroid plexus; however, under chronic hypoxia, while AQP1 levels remained almost unchanged, AQP4 passed from being hardly detectable in the choroid plexus to being a moderately expressed protein. In the other brain tissues analyzed, only a transient modification of AQP4 expression was observed in the cortex after 2 days of hypoxia. In this tissue, our results and previously reported data [45] suggest that hypoxia produces an early and transient induction of AQP4 mRNA expression, which results in an increment of AQP4 protein during the first 2 days. However, when the hypoxic situation is maintained longer, AQP4 protein levels tend to return to similar values than those found in normoxia.

The analysis of whether changes in the expression of AQPs in the choroid plexus and other limiting tissues (cells adjacent to brain vasculature, the blood-brain or blood-CSF barriers and ependymal cells bordering the ventricular system) could be involved in a larger hypoxic-dependent production of CSF led to two important findings: first, that hypoxia induces an increase in ventricular volume (likely due to greater production of CSF); and second, that AQP4 channels, and not AQP1 channels, are mainly responsible for the increase in CSF formation. The classic model to explain CSF formation and circulation is currently challenged by a new concept proposing that CSF is produced and absorbed throughout the entire CSF system. In this new model, the contribution of the fluid in the pericapillary space (Virchow-Robin space) to the filtration and reabsorption of CSF is proportionally much larger than that of the choroid plexus alone [52,53]. The results we present here are fully compatible with this hypothesis of Oreskovic and Klarica and are in agreement with results of Igarashi et al. [54], who found that, following intravenous injection of H<sup>17</sup>O, water entry into the brain is conducted by AQP4 and not AQP1.

How can hypoxia increase the ventricle CSF load, contributing to a hydrocephalic condition?, and in what way do AQPs participate in this process?, were basic questions that emerged from our findings. Previous studies had pointed to hypoxia among the potential causes for hydrocephalus and edema [51,55,56]; and increases in brain parenchyma volume and brain swelling in response to acute hypoxia had also been noted [57]. Equivalent to the hyperemic response to ischemia seen in several organs [58,59], an increment in cerebral blood flow (CBF) occurs in hypoxia as a compensatory mechanism to ensure oxygen supply to the brain. Thus, we postulate that the increase in CSF production observed in hypoxia is a direct consequence of the larger plasma filtration produced by the increase in hydrostatic pressure due to the overload of cerebral blood volume. The observed AQP4 overexpression in the choroid plexus induced by hypoxia will certainly contribute to the greater filtration that occurs during the hyperemic response. Nonetheless, considering that the contact surface between capillaries in the brain parenchyma is vastly larger than that in the choroid plexus [53], one should expect that most of the filtration would occur from capillaries in brain parenchyma. Then, IF would move to CSF space, driven by the low value of hydrostatic pressure in the CSF compartment, traversing AQP4 present in the pericapillary astrocyte foot processes, astrocytes of the pia mater, interstitial space, and ependymal cells. Consistent with this view, data reported by Ilif et al. [60] indicates that perivascular astroglial AQP4 facilitates the outflow of sub-arachnoid CSF from para-arterial spaces into the brain interstitial parenchyma, and the resulting IF clearance, by entrance of the fluid into the para-venous space. Differences in pressure between the arterial and venous extremes would drive the fluid and would favor clearance of solutes in a similar way to a lymphatic system, that is, through the so-

called “glymphatic system” [60,61]. In line with this, the results presented here support the view that AQP4 makes an important contribution to CSF formation independently and additional to choroid plexus secretion, and allow us to propose AQP4 as a critical therapeutic target, whose inhibition maybe desirable in forms of hydrocephalus involving overproduction of CSF, such as those that result from hypoxic or ischemic conditions.

Another important finding of our study should be highlighted, namely, that there is a resemblance between the hydrocephalic state induced in aged animals by chronic hypoxia and some of the main symptoms of iNPH. Features of adult chronic hydrocephalus depicted in our experimental model include increased ventricle size, a slight increase in intracranial pressure, cognitive deficits and alterations in the cerebral distensibility. This makes us believe that aged mice chronically treated with hypoxia represent an excellent experimental model to study pathophysiological features of iNPH and potential therapeutic options for this disease.

From a mechanistic point of view, the ventriculomegaly observed in aged wt mice, but not in aged AQP4<sup>-/-</sup> mice, is probably the result of a combination of two factors. Firstly, a greater production of CSF is critically related to the increase in blood flow under chronic hypoxia [57,62–64] and facilitated by the larger amount of AQP4 found in the cortex and choroid plexus of aged animals. Secondly, but even more importantly, a reduced evacuation of CSF and altered ventricular compliance is associated with aging and is exacerbated by hypoxia (Fig. 6). In that respect, our results, and those of other authors, firmly sustain the view that a dysfunctional CSF outflow system contributes to hydrocephalic conditions. Altered expression and delocalization of cortical perivascular AQP4 have been observed in aged brains of both humans [35] and other animals [47] and are associated with the impairment of effective removal of CSF in both cases. Hence, the more severe astrogliosis we observed in the cortex of aged hypoxic brains may also be associated with a loss of perivascular AQP4 polarization and reduced CSF outflow. The growth in CSF production after exposure to hypoxia was only accompanied by an increase in IVP in aged animals, in which a reduced CSF evacuation and reduced compliance of the ventricular system help to explain the high IVP values. In aged animals, defects in the evacuation of CSF, by reduced compliance of the ventricular system and/or by impaired functioning of the glymphatic system, would contribute to the pronounced ventriculomegaly and high IVP values. In accord with these findings, age-related dysfunctional fibrosis of *Aracnoides* granulations producing similar effects on CSF evacuation has been reported in humans [65,66].

Cognitive deterioration observed in aged hypoxic mice could be produced by mechanical compression of neuronal circuits critical for memory consolidation due to the edema and ventriculomegaly. However, alterations in the glymphatic system and the reduced clearance of CSF could also be related to these cognitive deficits [60,67]. Signs of reduced glymphatic clearance have been observed in patients with iNPH by gadobutrol-enhanced MRI and allow authors to propose that dementia in these patients may be associated with impaired glymphatic function [68]. Additionally, it has been proposed that altered clearance of CSF and  $\beta$ -amyloid proteins in aged brains contributes to the cognitive deterioration observed in patients with Alzheimer disease [35,60].

In conclusion, the present study demonstrates, for the first time, that hypoxia and aging act synergistically to produce hydrocephalus in mice. Three elements contribute decisively to this effect, namely: (i) greater but disorganized presence of AQP4 channels, (ii) lower CSF evacuation rate and (iii) reduced cerebral compliance. Our results suggest a need to develop pharmacological interventions aiming to regulate AQP4 channel transport and such interventions should be tested in future experiments investigating the onset of hydrocephalus or potential treatment strategies. In relation to this, acetazolamide, an inhibitor of AQP4 water flux [69] has been used in various different hydrocephalic conditions [70], including patients with iNPH, showing

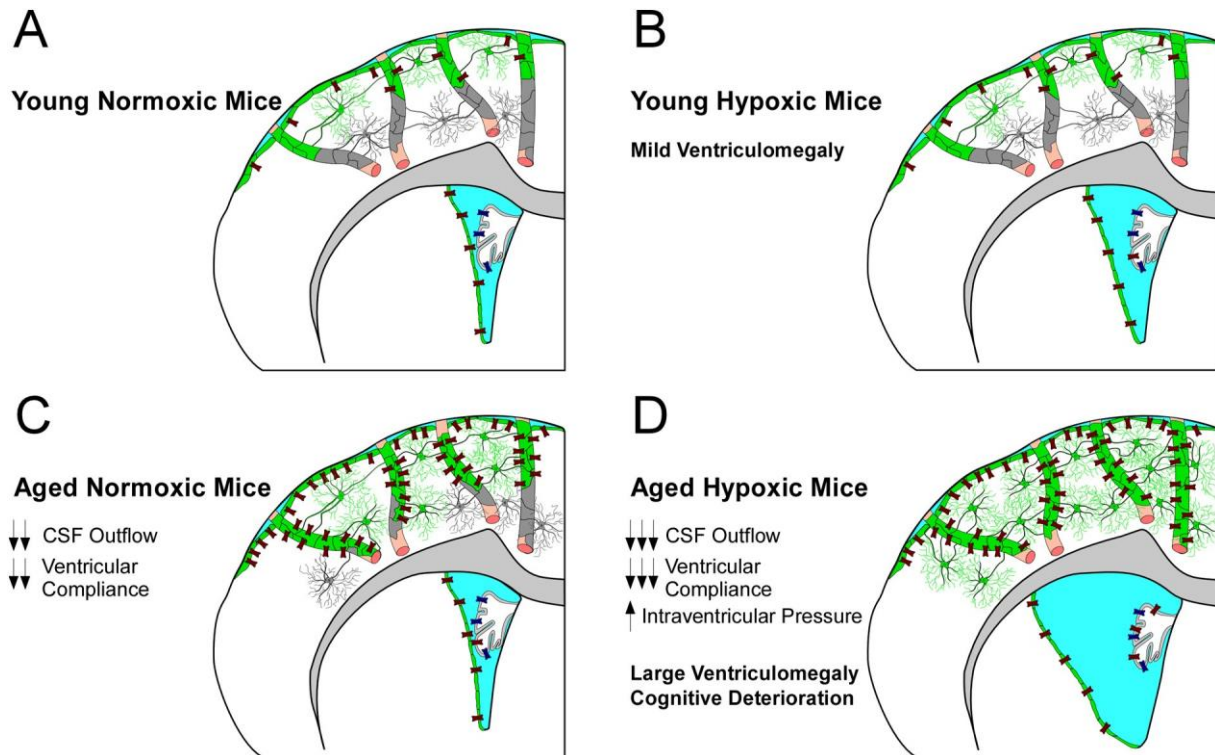


Fig. 6. Model of age-related hydrocephalus associated with chronic hypoxia.

(A) In young normoxic mice, AQP4 (red channels, present on glial bordering membranes and astrocyte foot processes) and AQP1 (blue channels, expressed on choroid plexus) participate in CSF formation. (B) Chronic hypoxia induces, in young mice, AQP4 expression in the choroid plexus and mild ventriculomegaly dependent on AQP4 expression. (C) In aged normoxic mice, AQP4 expression increased in cortical glial cells and choroid plexus, and CSF outflow and ventricular compliance decreased. (D) Chronic hypoxia in aged mice induces pronounced ventriculomegaly, with increased intraventricular pressure, resulting in cognitive deterioration. This hydrocephalic condition is produced by CSF overload on the ventricles, which is facilitated by the higher amounts of AQP4, the reduced capability to evacuate CSF and the altered ventricular compliance of the aged cerebral parenchyma.

GFAP<sup>high</sup> astrocytes are represented in green and GFAP<sup>low</sup> astrocytes in grey.

clear beneficial effects [71,72]. Finally, from a clinical point of view our experimental results suggest that a hypoxic situation could have a prominent role in the onset of adult hydrocephalus.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.006>.

#### Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

#### Acknowledgments

This study has been supported by grants FIS: PI12/01882 and PI16/00493 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, co-financed by the Carlos III Health Institute (ISCIII) and European Regional Development Fund (FEDER). JLTC was partially supported by the Regional Government of Andalusia and FEDER funds through a program for recruitment of young researchers.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### Ethical approval

All procedures in studies involving animals were performed in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted.

#### References

- [1] A. Wald, G.M. Hochwald, M. Gandhi, Evidence for the movement of fluid, macromolecules and ions from the brain extracellular space to the CSF, *Brain Res.* 151 (1978) 283–290.
- [2] C.E. Johanson, *Ventricles and CSF*, Neuroscience in Medicine, Philadelphia, 1995.
- [3] T.H. Milhorat, M.K. Hammock, J.D. Fenstermacher, V.A. Levin, Cerebrospinal fluid production by the choroid plexus and brain, *Science* 173 (1971) 330–332.
- [4] M.B. Segal, M. Pollay, The secretion of cerebrospinal fluid, *Exp. Eye Res.* 25 (1977) 127–148.
- [5] H. Davson, G. Hollingsworth, M.B. Segal, The mechanism of drainage of the cerebrospinal fluid, *Brain* 93 (1970) 665–678.
- [6] K. Welch, Secretion of cerebrospinal fluid by choroid plexus of the rabbit, *Am. J. Phys.* 205 (1963) 617–624.
- [7] H. TUMANI, A. HUSS, F. BACHHUBER, The cerebrospinal fluid and barriers - anatomical and physiologic considerations, *Handb. Clin. Neurol.* 146 (2017) 21–32.
- [8] M. Amiry-Moghaddam, O.P. Ottersen, The molecular basis of water transport in the brain, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 991–1001.
- [9] M. Zelenina, Regulation of brain aquaporins, *Neurochem. Int.* 57 (2010) 468–488.
- [10] M.C. Papadopoulos, A.S. Verkman, Aquaporin water channels in the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 265–277.
- [11] A.S. Verkman, Physiological importance of aquaporin water channels, *Ann. Med.* 34 (2002) 192–200.
- [12] S. Nielsen, B.L. Smith, E.I. Christensen, P. Agre, Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 (1993) 7275–7279.
- [13] K. Oshio, D.K. Binder, Y. Liang, A. Bollen, B. Feuerstein, M.S. Berger, G.T. Manley, Expression of the aquaporin-1 water channel in human Glial tumors, *Neurosurgery* 56 (2005) 375–381.
- [14] K. Oshio, H. Watanabe, Y. Song, A.S. Verkman, G.T. Manley, Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1, *FASEB J.* 19 (2005) 76–78.
- [15] T. Speake, C. Whitwell, H. Kajita, A. Majid, P.D. Brown, Mechanisms of CSF secretion by the choroid plexus, *Microsc. Res. Tech.* 52 (2001) 49–59.
- [16] E.A. Nagelhus, O.P. Ottersen, Physiological roles of aquaporin-4 in brain, *Physiol. Rev.* 93 (2013) 1543–1562.
- [17] D. Wang, M. Nykanen, N. Yang, D. Winlaw, K. North, A.S. Verkman, B.K. Owler, Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency, *Mol. Cell. Neurosci.* 46 (2011) 318–324.



- [18] J. Badaut, F. Lasbennes, P.J. Magistretti, L. Regli, Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 367–378.
- [19] T. Tzourzakis, I. Dragou, Y. Fushimi, M.S. Deloire, C. Boiziau, B. Brochet, C. Moonen, K.G. Petry, V. Dousset, Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological study, *NeuroImage* 47 (2009) 659–666.
- [20] M.J. Schmidt, C. Rummel, J. Hauer, M. Kolecka, N. Ondreka, V. McClure, J. Roth, Increased CSF aquaporin-4, and interleukin-6 levels in dogs with idiopathic communicating internal hydrocephalus and a decrease after ventriculo-peritoneal shunting, *Fluids Barriers CNS* 13 (2016) 12.
- [21] K. Aghayev, E. Bal, T. Rahimli, M. Mut, S. Balci, F. Vrionis, N. Akalan, Aquaporin-4 expression is not elevated in mild hydrocephalus, *Acta Neurochir.* 154 (2012) 753–759 (discussion 759).
- [22] A.D. Skjolding, A.V. Holst, H. Broholm, H. Laursen, M. Juhler, Differences in distribution and regulation of astrocytic aquaporin-4 in human and rat hydrocephalic brain, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39 (2013) 179–191.
- [23] L.K. Page, Cerebrospinal fluid and extracellular fluid: their relationship to pressure and duration of canine hydrocephalus, *Childs Nerv. Syst.* 1 (1985) 12–17.
- [24] O. Bloch, K.I. Auguste, G.T. Manley, A.S. Verkman, Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26 (2006) 1527–1537.
- [25] M.C. Papadopoulos, G.T. Manley, S. Krishna, A.S. Verkman, Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema, *FASEB J.* 18 (2004) 1291–1293.
- [26] M.Y. Kalani, A.S. Filippidis, H.L. Rekte, Hydrocephalus and aquaporins: the role of aquaporin-1, *Acta Neurochir. Suppl.* 113 (2012) 51–54.
- [27] A.S. Filippidis, M.Y. Kalani, H.L. Rekte, Hydrocephalus and aquaporins: the role of aquaporin-4, *Acta Neurochir. Suppl.* 113 (2012) 55–58.
- [28] A.J. Espay, G.A. Da Prat, A.K. Dwivedi, F. Rodriguez-Porcel, J.E. Vaughan, M. Rosso, J.L. Devoto, A.P. Duker, M. Maselli, C.D. Smith, G.T. Mandaybur, A. Merola, A.E. Lang, Deconstructing normal pressure hydrocephalus: ventriculomegaly as early sign of neurodegeneration, *Ann. Neurol.* 82 (2017) 503–513.
- [29] H. Wessling, C.L. Simosono, M. Escosa-Bage, P. de las Heras-Echeverria, Continuous cerebral PO<sub>2</sub> measurements in awake patients as a diagnostic tool in suspected chronic adult hydrocephalus—a retrospective study of 10 cases, *Acta Neurochir. (Wien)* 149 (2007) 239–244 (discussion 244).
- [30] S.M. Dombrowski, A. Deshpande, C. Dingwall, A. Leichter, Z. Leibson, M.G. Luciano, Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus, *Neuroscience* 152 (2008) 346–359.
- [31] J.Y. Ding, C.W. Kreipke, S.L. Speirs, P. Schafer, S. Schafer, J.A. Rafols, Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury, *Neurosci. Lett.* 453 (2009) 68–72.
- [32] N. Yamamoto, K. Yoneda, K. Asai, K. Sobue, T. Tada, Y. Fujita, H. Katsuya, M. Fujita, N. Aihara, M. Mase, K. Yamada, Y. Miura, T. Kato, Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 90 (2001) 26–38.
- [33] I. Abreu-Rodriguez, R.O. Sanchez Silva, A.P. Martins, G.A. Soveral, J.J. Toledo-Aral, J. Lopez-Barneo, M. Echevarria, Functional and transcriptional induction of aquaporin-1 gene by hypoxia; analysis of promoter and role of Hif-1 $\alpha$ , *PLoS ONE* 6 (2011) e28385.
- [34] M. Echevarria, A.M. Muñoz-Cabello, R.O. Sanchez-Silva, J.J. Toledo-Aral, J. Lopez-Barneo, Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 30207–30215.
- [35] D.M. Zeppenfeld, M. Simon, J.D. Haswell, D. D'Abreo, C. Murchison, J.F. Quinn, M.R. Grafe, R.L. Woltjer, J. Kaye, J.J. Iliff, Association of perivascular localization of aquaporin-4 with cognition and Alzheimer disease in aging brains, *JAMA Neurol.* 74 (2017) 91–99.
- [36] P. Hellstrom, P. Klinge, J. Tans, C. Wikkelso, A new scale for assessment of severity and outcome in iNPH, *Acta Neurol. Scand.* 126 (2012) 229–237.
- [37] M. Hashimoto, M. Ishikawa, E. Mori, N. Kuwana, Study of I.O.N.I., Diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus is supported by MRI-based scheme: a prospective cohort study, *Cerebrospinal Fluid Res.* 7 (2010) 18.
- [38] T. Ma, B. Yang, A. Gillespie, E.J. Carlson, C.J. Epstein, A.S. Verkman, Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 957–962.
- [39] A. Galan-Cobo, R. Ramirez-Lorca, J.J. Toledo-Aral, M. Echevarria, Aquaporin-1 plays important role in proliferation by affecting cell cycle progression, *J. Cell. Physiol.* 231 (2016) 243–256.
- [40] A.M. Muñoz-Cabello, J. Villadiego, J.J. Toledo-Aral, J. Lopez-Barneo, M. Echevarria, AQP1 mediates water transport in the carotid body, *Pflügers Archiv* 459 (2010) 775–783.
- [41] A.B. Munoz-Manchado, J. Villadiego, N. Suarez-Luna, A. Bermejo-Navas, P. Garrido-Gil, J.L. Labandeira-Garcia, M. Echevarria, J. Lopez-Barneo, J.J. Toledo-Aral, Neuroprotective and reparative effects of carotid body grafts in a chronic MPTP model of Parkinson's disease, *Neurobiol. Aging* 34 (2013) 902–915.
- [42] A.B. Munoz-Manchado, J. Villadiego, S. Romo-Madero, N. Suarez-Luna, A. Bermejo-Navas, J.A. Rodriguez-Gomez, P. Garrido-Gil, J.L. Labandeira-Garcia, M. Echevarria, J. Lopez-Barneo, J.J. Toledo-Aral, Chronic and progressive Parkinson's disease MPTP model in adult and aged mice, *J. Neurochem.* 136 (2016) 373–387.
- [43] J. Villadiego, A. Labrador-Garrido, J.M. Franco, M. Leal-Lasarte, E.J. De Genst, C.M. Dobson, D. Pozo, J.J. Toledo-Aral, C. Roodveldt, Immunization with alpha-synuclein/Grp94 reshapes peripheral immunity and suppresses microglial activation in a chronic Parkinsonism model, *Glia* 66 (2018) 191–205.
- [44] A. Wolf, B. Bauer, E.L. Abner, T. Ashkenazy-Frolinger, A.M. Hartz, A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129SvEv/Tg2576 mice, *PLoS One* 11 (2016) e0147733.
- [45] S.J. Chen, J.F. Yang, F.P. Kong, J.L. Ren, K. Hao, M. Li, Y. Yuan, X.C. Chen, R.S. Yu, J.F. Li, G. Leng, X.Q. Chen, J.Z. Du, Overactivation of corticotropin-releasing factor receptor type 1 and aquaporin-4 by hypoxia induces cerebral edema, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 13199–13204.
- [46] A. Zeisel, A.B. Munoz-Manchado, S. Codeluppi, P. Lonnerberg, G. La Manno, A. Jureus, S. Marqués, H. Munguba, L. He, C. Betsholtz, C. Rolny, G. Castelo-Branco, J. Hjerling-Leffler, S. Linnarsson, Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq, *Science* 347 (2015) 1138–1142.
- [47] B.T. Kress, J.J. Iliff, M. Xia, M. Wang, H.S. Wei, D. Zeppenfeld, L. Xie, H. Kang, Q. Xu, J.A. Liew, B.A. Plog, F. Ding, R. Deane, M. Nedergaard, Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain, *Ann. Neurol.* 76 (2014) 845–861.
- [48] B. Desai, Y. Hsu, B. Schneller, J.G. Hobbs, A.I. Mehta, A. Linninger, Hydrocephalus: the role of cerebral aquaporin-4 channels and computational modeling considerations of cerebrospinal fluid, *Neurosurg. Focus.* 41 (2016) E8.
- [49] C. Zhang, J. Chen, H. Lu, Expression of aquaporin-4 and pathological characteristics of brain injury in a rat model of traumatic brain injury, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015) 7351–7357.
- [50] D.S. Frydenlund, A. Bhardwaj, T. Otsuka, M.N. Mylonakou, T. Yasumura, K.G. Davidson, E. Zeynalov, O. Skare, P. Laake, F.M. Haug, J.E. Rash, P. Agre, O.P. Ottersen, M. Amiry-Moghaddam, Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13532–13536.
- [51] D.C. Curran-Everett, J. Iwamoto, M.P. Meredith, J.A. Krasney, Intracranial pressures and O<sub>2</sub> extraction in conscious sheep during 72 h of hypoxia, *Am. J. Physiol.* 261 (1991) H103–H109.
- [52] D. Oreskovic, M. Rados, M. Klarica, Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics, *Neuroscience* 354 (2017) 69–87.
- [53] D. Oreskovic, M. Klarica, Development of hydrocephalus and classical hypothesis of cerebrospinal fluid hydrodynamics: facts and illusions, *Prog. Neurobiol.* 94 (2011) 238–258.
- [54] H. Igarashi, M. Tsujita, I.L. Kwee, T. Nakada, Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 170 JIVCPE MRI study in knockout mice, *Neuroreport* 25 (2014) 39–43.
- [55] D.E. Sakas, H.L. Whitwell, R.J. Watkins, D.J. Beale, Ultra early transient brain swelling following brief intraoperative ischaemia-reperfusion, *J. Clin. Neurosci.* 6 (1999) 324–325.
- [56] H. Williams, A unifying hypothesis for hydrocephalus and the Chiari malformations part two: the hydrocephalus filling mechanism, *Med. Hypotheses* 94 (2016) 30–39.
- [57] D.J. Dubowitz, E.A. Dyer, R.J. Theilmann, R.B. Buxton, S.R. Hopkins, Early brain swelling in acute hypoxia, *J. Appl. Physiol.* 107 (2009) 244–252.
- [58] J. Loscalzo, J.A. Vita, Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology and complex molecular adaptations, *Circulation* 90 (1994) 2556–2559.
- [59] A. Menyhart, D. Zolei-Szenasi, T. Puskas, P. Makra, F. Bari, E. Farkas, Age or ischemia uncouples the blood flow response, tissue acidosis, and direct current potential signature of spreading depolarization in the rat brain, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 313 (2017) H328–H337.
- [60] J.J. Iliff, M. Wang, Y. Liao, B.A. Plogg, W. Peng, G.A. Gundersen, H. Benveniste, G.E. Vates, R. Deane, S.A. Goldman, E.A. Nagelhus, M. Nedergaard, A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ , *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) 147ra111.
- [61] J.J. Iliff, H. Lee, M. Yu, T. Feng, J. Logan, M. Nedergaard, H. Benveniste, Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 1299–1309.
- [62] E.A. Dyer, S.R. Hopkins, J.E. Perthen, R.B. Buxton, D.J. Dubowitz, Regional cerebral blood flow during acute hypoxia in individuals susceptible to acute mountain sickness, *Respir. Physiol. Neurobiol.* 160 (2008) 267–276.
- [63] M.H. Wilson, C.H. Imray, A.R. Hargens, The headache of high altitude and microgravity—similarities with clinical syndromes of cerebral venous hypertension, *High Alt. Med. Biol.* 12 (2011) 379–386.
- [64] J.S. Lawley, B.D. Levine, M.A. Williams, J. Malm, A. Eklund, D.M. Polaner, A.W. Subudhi, P.H. Hackett, R.C. Roach, Cerebral spinal fluid dynamics: effect of hypoxia and implications for high-altitude illness, *J. Appl. Physiol.* 120 (2016) 215–225.
- [65] K. Akai, S. Uchigasaki, U. Tanaka, A. Komatsu, Normal pressure hydrocephalus. Neuropathological study, *Acta Pathol. Jpn.* 37 (1987) 97–110.
- [66] S. Destian, L.A. Heier, R.D. Zimmerman, S. Morgello, M.D. Deck, Differentiation between meningeal fibrosis and chronic subdural hematoma after ventricular shunting: value of enhanced CT and MR scans, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 10 (1989) 1021–1026.
- [67] W. Peng, T.M. Acharyar, B. Li, Y. Liao, H. Mestre, E. Hitomi, S. Regan, T. Kasper, S. Peng, F. Ding, H. Benveniste, M. Nedergaard, R. Deane, Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease, *Neurobiol. Dis.* 93 (2016) 215–225.
- [68] G. Ringstad, S.A.S. Vatnehol, P.K. Eide, Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus, *Brain* 140 (2017) 2691–2705.
- [69] Y. Tanimura, Y. Hiroaki, Y. Fujiyoshi, Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4, *J. Struct. Biol.* 166 (2009) 16–21.
- [70] F. Gao, M. Zheng, Y. Hua, R.F. Keep, G. Xi, Acetazolamide attenuates thrombin-induced hydrocephalus, *Acta Neurochir. Suppl.* 121 (2016) 373–377.
- [71] M. Ivkovic, M. Reiss-Zimmermann, H. Katzen, M. Preuss, I. Kovanlikaya, L. Heier, N. Alperin, K.T. Hoffmann, N. Relkin, MRI assessment of the effects of acetazolamide and external lumbar drainage in idiopathic normal pressure hydrocephalus, *Fluids Barriers CNS* 12 (2015) 9.
- [72] G.J. Gilbert, N. Alperin, C. Olio, N. Relkin, Low-dose acetazolamide reverses periventricular white matter hyperintensities in iNPH, *Neurology* 83 (2014) 1773.

**SUPPLEMENTARY MATERIAL****Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus**  
Trillo-Contreras et al., 2018

**Supplementary Material-1: Primers and validations for quantitative PCR** (A) Primer sequences used for quantitative PCR. (B) Expression levels of AQP4-mRNA represented as  $2^{-\Delta Ct}$  in choroid plexus, cortex, ependymal lateral and 3th ventricle, and striatum of WT animals in normoxia. (C) Dissociation curve of AQP4 qPCR, represented as fluorescence derivative versus temperature, for dissociation of products and negative control. (D) Image of a representative agarose gel showing the final AQP4-qPCR products from different cDNA samples and negative control. (E) Standard curve of AQP4 qPCR represented as delta Rn (levels of fluorescence) versus the cycle number (Ct value).

**Supplementary Material-2: Brain AQP4 protein expression in young mice exposed to hypoxia.** Immunofluorescence images for AQP4 and GFAP from ependymal tissue from lateral ventricle (lateral region, adjacent to the striatum; Ep<sub>Lat.V</sub>; A), ependymal tissue from 3<sup>rd</sup> ventricle (ventral, adjacent to dorsomedial hypothalamic nucleus; Ep<sub>3th.V</sub>; B) and striatum (Str; C) obtained from mice exposed to hypoxia (10% O<sub>2</sub>; 2 and 5 days) and normoxic controls. n=3 per experimental group.

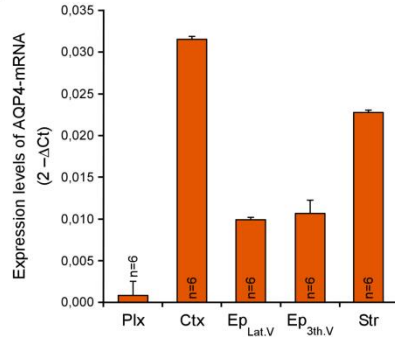
**Supplementary Material-3: Effect of aging and hypoxia on brain AQP4 expression.** (A-C) Immunofluorescence images for AQP4 and GFAP of ependymal tissue from lateral ventricle (lateral region, adjacent to the striatum; Ep<sub>Lat.V</sub>; A), 3<sup>rd</sup> ventricle (ventral, adjacent to dorsomedial hypothalamic nucleus; Ep<sub>3th.V</sub>; B) and striatum (Str; C) obtained from young normoxic, aged normoxic and aged hypoxic (10% O<sub>2</sub>; 5 days) mice. n=5 per experimental group.

**Supplementary Material-4: Systemic arterial pressure measurements in young and aged wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice exposed to hypoxia or normoxia.** Values (as mean  $\pm$  S.E.M) of systolic, diastolic and mean blood pressure of young (A) and aged (B) wt, AQP1<sup>-/-</sup> and AQP4<sup>-/-</sup> mice exposed to normoxia or chronic hypoxia (10% O<sub>2</sub>; 5 days). n indicates the number of animals analyzed per experimental condition.

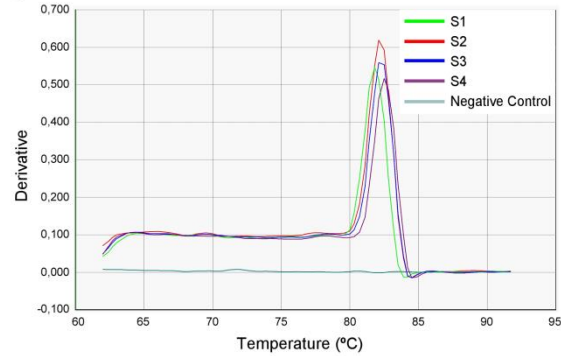
A

Gene	Primer forward	Primer reverse
AQP1	TTCACCTGGCCGCAATGA	CCAGCTGCAGAGTGCCAAT
AQP4	CCGTCTTCTACATCATTGCACAGT	GCGGTGAGGTTTCCATGAA
18S	AACGAGACTCTGGCATGCTAA	GCCACTTGCCCTCTAAGAAGT

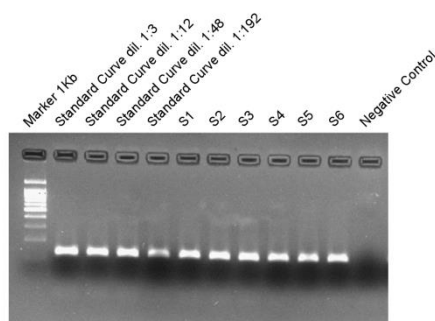
B



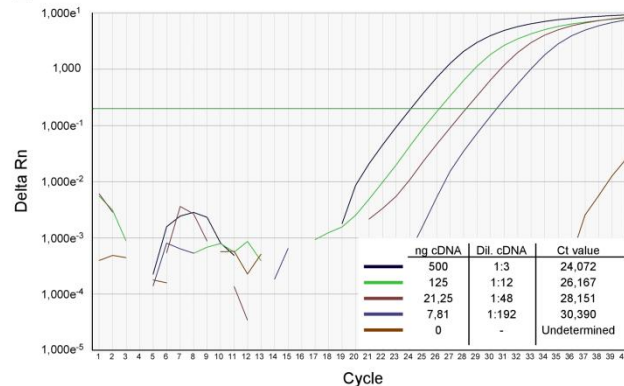
C

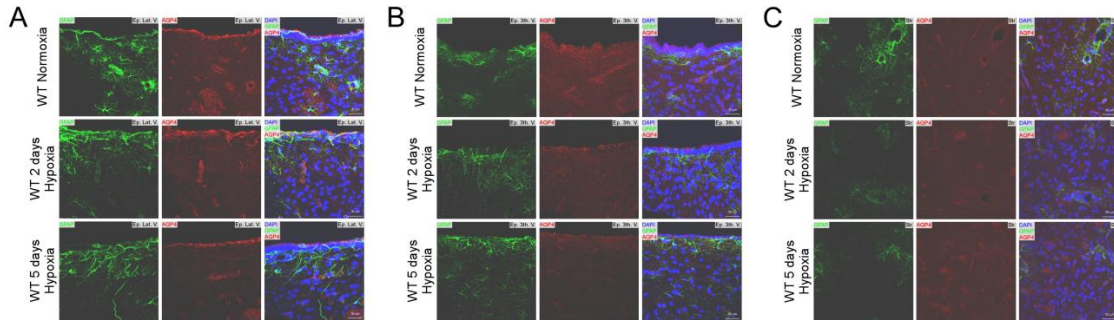


D

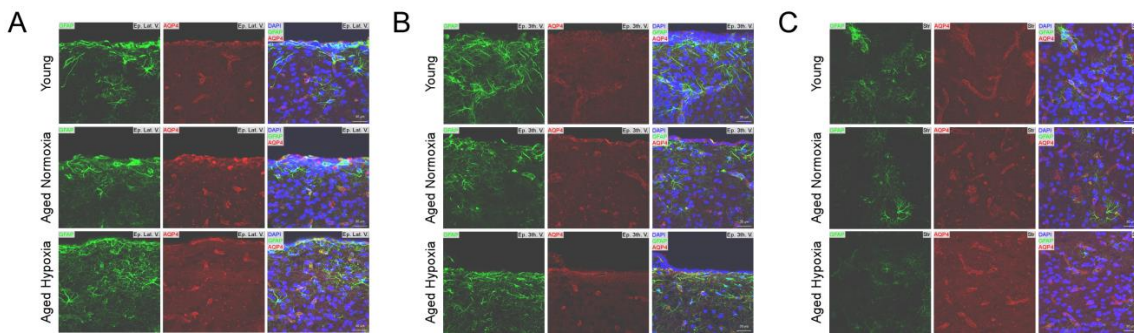


E





**Supplementary Material-2**  
**Trillo-Contreras et al., 2018**



**Supplementary Material-3**  
**Trillo-Contreras et al., 2018**

## A

Young mice: systemic arterial pressure				
	n	Systolic blood pressure (mm Hg)	Diastolic blood pressure (mm Hg)	Mean blood pressure (mm Hg)
<b>Normoxia</b>				
wt	6	121,95 ± 3,90	52,74 ± 3,09	75,81 ± 3,29
AQP1 <sup>-/-</sup>	7	108,68 ± 7,41	44,75 ± 2,92	66,06 ± 4,19
AQP4 <sup>-/-</sup>	7	125,64 ± 2,16	47,20 ± 1,79	73,35 ± 1,78
<b>Hypoxia</b>				
wt	8	119,69 ± 2,80	51,17 ± 2,53	74,01 ± 2,17
AQP1 <sup>-/-</sup>	7	106,83 ± 4,80	52,37 ± 6,32	70,53 ± 5,73
AQP4 <sup>-/-</sup>	10	113,93 ± 6,00	47,07 ± 3,71	69,35 ± 4,30

## B

Aged mice: systemic arterial pressure				
	n	Systolic blood pressure (mm Hg)	Diastolic blood pressure (mm Hg)	Mean blood pressure (mm Hg)
<b>Normoxia</b>				
wt	7	119,57 ± 3,66	49,66 ± 2,25	72,96 ± 2,05
AQP1 <sup>-/-</sup>	4	109,29 ± 6,54	51,77 ± 6,66	70,94 ± 6,45
AQP4 <sup>-/-</sup>	7	123,21 ± 3,81	62,94 ± 4,54	83,03 ± 4,03
<b>Hypoxia</b>				
wt	10	107,54 ± 6,15	47,63 ± 2,08	67,60 ± 3,36
AQP1 <sup>-/-</sup>	4	110,57 ± 5,60	52,48 ± 4,62	71,84 ± 4,75
AQP4 <sup>-/-</sup>	7	117,07 ± 3,57	50,83 ± 2,36	72,91 ± 2,48

Supplementary Material-4  
Trillo-Contreras et al., 2018



### 3. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DE LAS ALTERACIONES FISIOLÓGICAS TRAS LA ELIMINACIÓN DEL ESTÍMULO HIPÓXICO

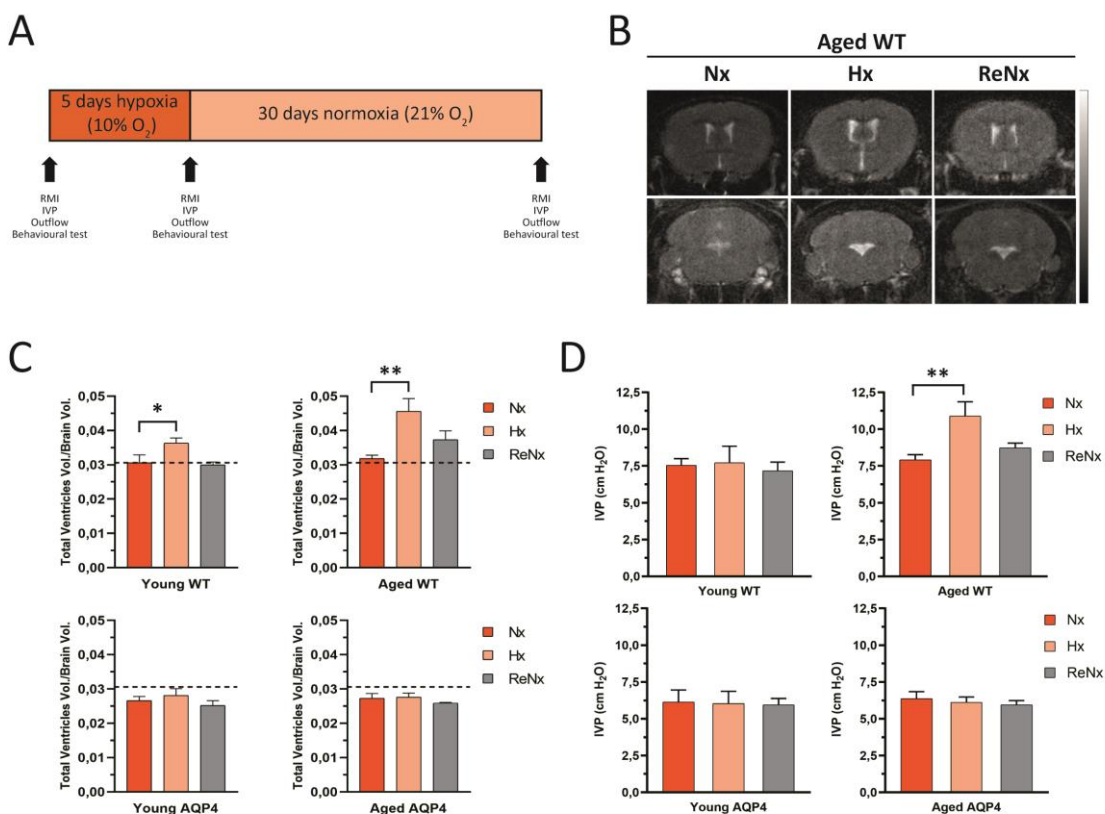
Los resultados obtenidos en la sección anterior muestran que una desorganizada sobreexpresión de AQP4 se ve asociada con el envejecimiento, contribuyendo de forma decisiva al desarrollo inicial de la condición de hidrocefalia, y esta se produce cuando se somete al animal a Hx. En este último estudio, que a continuación se describe, quisimos explorar si las alteraciones fisiológicas que se producen por la exposición crónica a la Hx perduran en el tiempo tras el cese del estímulo hipóxico, o si existe una recuperación de la función. Para ello, se estudiaron dos modelos de ratón (wt y AQP4<sup>-/-</sup>), de edades distintas (jóvenes, de entre 2-4 meses, y viejos, de más de 14 meses de edad) mantenidos bajo diferentes condiciones de oxigenación [Nx, al 21% de O<sub>2</sub>; Hx durante 5 días al 9% de O<sub>2</sub>; y renormoxia (ReNx) de 30 días tras el estímulo hipóxico, al 21% de O<sub>2</sub>], y analizamos si los cambios en los parámetros fisiológicos (volumen ventricular, IVP, tasa de evacuación de CSF y distensibilidad del sistema ventricular) y el deterioro cognitivo asociado se revierten tras la eliminación del estímulo hipóxico y con la vuelta a una situación de oxigenación control. En la **Figura 10A** se representa en un diagrama los cambios en las condiciones de oxigenación a los que fueron sometidos los distintos modelos animales de estudio, y los tres puntos temporales en los cuales se realizaron los ensayos comportamentales y fisiológicos, resultando en las tres condiciones planteadas: Nx, Hx y ReNx.

#### **3.1. La renormoxia reestablece los valores de producción del líquido cefalorraquídeo y revierte el deterioro cognitivo en ratones envejecidos.**

Las medidas volumétricas del tamaño ventricular, analizados mediante MRI, indicaron que no existen diferencias significativas entre los grupos Nx y ReNx, como se muestra en la **Figura 10C**. De esta forma, se evidencia que tanto los ratones wt jóvenes como wt viejos se recuperan de la ventriculomegalia desarrollada por el tratamiento hipóxico, tras treinta días de vuelta a las condiciones de normoxia (ReNx). En los ratones AQP4<sup>-/-</sup>, tanto jóvenes como viejos, no se aprecian cambios en el volumen ventricular ni tras la exposición a Hx, ni transcurridos los

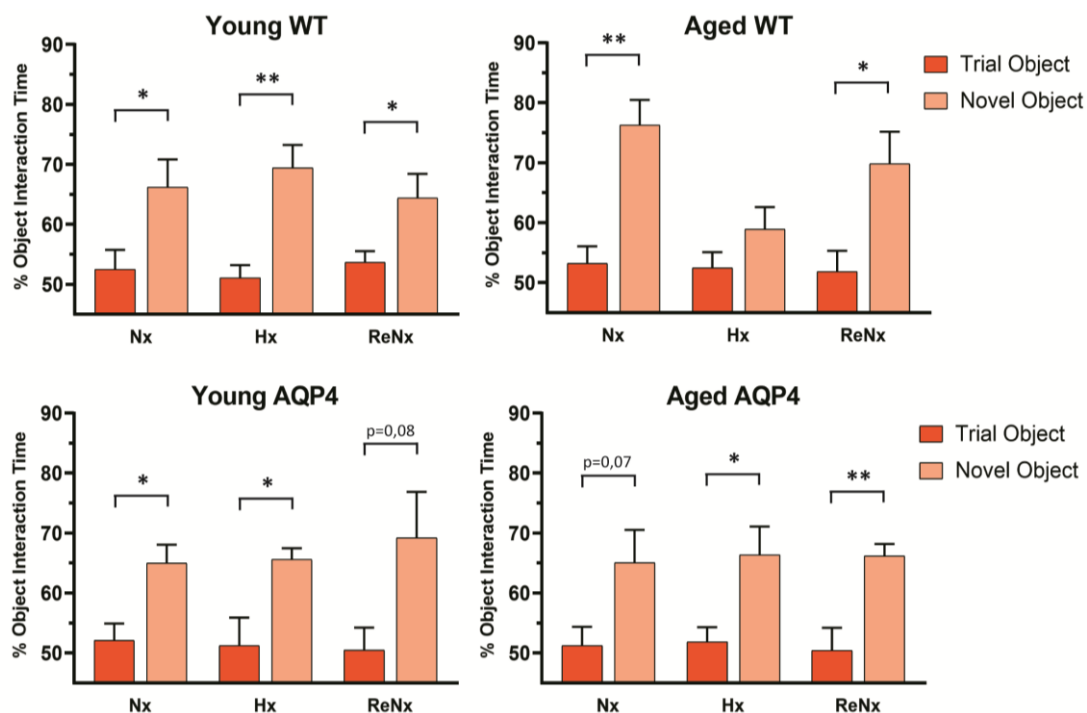
30 días en situación de ReNx, en línea con los resultados del trabajo previo en el que se mostraba la necesidad de la presencia de AQP4 para que la Hx produzca un aumento en el volumen ventricular.

De igual modo, los datos de IVP mostraron un comportamiento similar al descrito antes para el volumen ventricular. Los ratones wt viejos se recuperan de la ventriculomegalia producida por la Hx tras la ReNx, y por tanto no se detectan diferencias estadísticas con la situación inicial de Nx. Mientras que en los demás grupos experimentales (wt joven, AQP4<sup>-/-</sup> joven y AQP4<sup>-/-</sup> viejo) no se observaron cambios en la IVP tras la exposición a Hx y, en consonancia con ello, los valores de IVP no se modificaron tampoco tras el período de ReNx (Figura 10D).

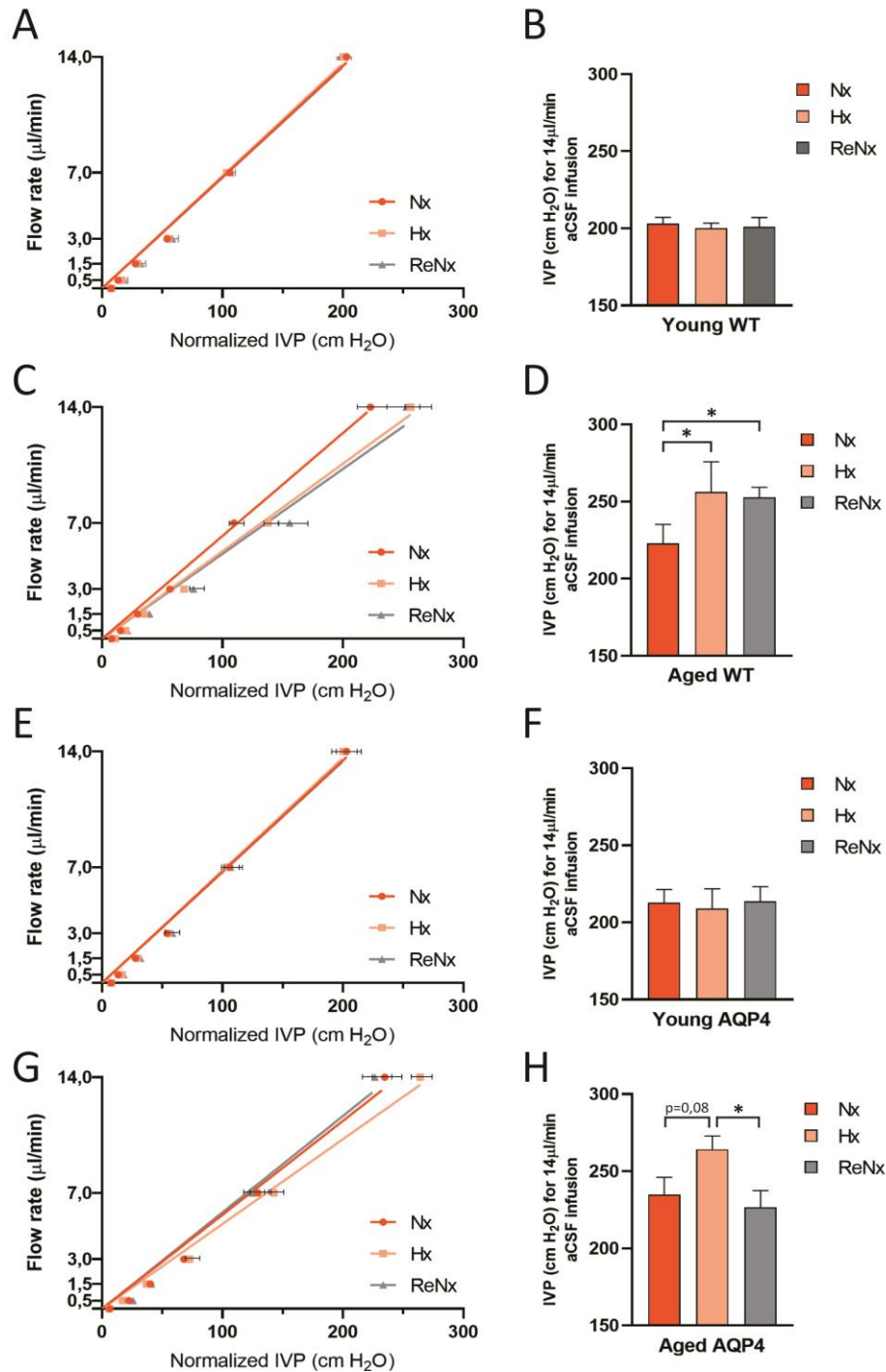


**Figura 10. Protocolo experimental y análisis de la producción de CSF.** (A) Diagrama en el que se muestra el protocolo experimental seguido para cada grupo de estudio: wt joven, wt viejo, AQP4<sup>-/-</sup> joven y AQP4<sup>-/-</sup> viejo; todos ellos bajo condiciones de Nx (21% O<sub>2</sub>), Hx (10% O<sub>2</sub> durante 5 días) y ReNx (30 días al 21% O<sub>2</sub> tras el periodo de Hx). Tras estos tratamientos se llevaron a cabo ensayos comportamentales y fisiológicos en cada uno de los puntos señalados con flechas. (B) MRI de secciones coronales de cerebro de ratones wt viejos en Nx, expuestos a Hx y tras ReNx. (C) Cuantificación del volumen ventricular cerebral (cociente del volumen ventricular respecto al volumen cerebral total de cada animal) en los cuatro grupos de estudio tratados bajo las condiciones descritas en (A). (D) Valores de presión intraventricular (IVP) registradas en los cuatro grupos de estudio y en las condiciones ya mencionadas. Los datos están representados como la media ± S.E.M. Número de animales analizados en cada grupo experimental n = 5 – 12. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Con objeto de conocer si la reversión de la ventriculomegalia en ReNx conlleva también a una recuperación en la función cognitiva, llevamos a cabo estudios comportamentales de “*novel object recognition*”. Como se ha mostrado en el trabajo previo, la hidrocefalia inducida por Hx en los animales wt produce un deterioro cognitivo suficiente para impedir que reconozcan los objetos nuevos empleados en el test. En concordancia con los datos obtenidos mediante MRI y IVP, tras el período de ReNx, los ratones wt viejos recuperan la capacidad cognitiva, lo que parece relacionado con la reversión de la ventriculomegalia severa desarrollada en estos ratones (**Figura 11**). El resto de grupos experimentales (wt joven, AQP4<sup>-/-</sup> joven y AQP4<sup>-/-</sup> viejo) no presentaban alteraciones significativas en su capacidad cognitiva tras el estímulo hipóxico, dato consistente con que estos ratones no desarrollan ventriculomegalia y, por tanto, era esperable en ellos que el período de ReNx tampoco afectase a su capacidad de reconocer objetos nuevos.



**Figura 11. Evaluación de la función cognitiva mediante el ensayo comportamental “*novel object recognition*”.** En la figura se muestra el análisis del test realizado como porcentaje de tiempo de interacción con el objeto nuevo respecto del antiguo, para cada grupo experimental en las condiciones de Nx, Hx y ReNx. Nótese la pérdida de la capacidad para discriminar entre ambos objetos en los ratones wt viejos en situación de Hx, y la recuperación de la misma tras ser sometidos a un período de ReNx, coincidiendo con la reversión de la ventriculomegalia. Los datos están representados como la media  $\pm$  S.E.M. Número de animales analizados en cada grupo experimental n= 5 – 12. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



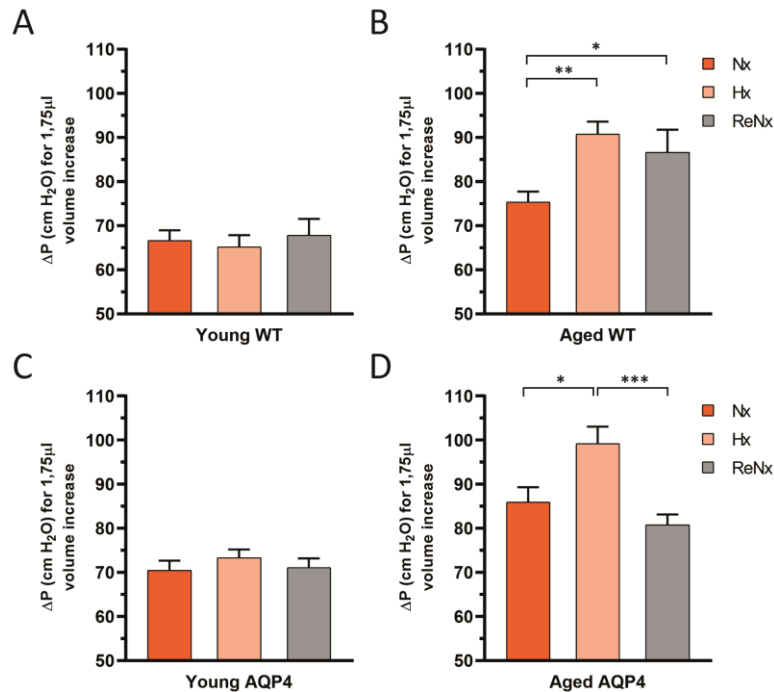
**Figura 12. Estudio de la capacidad de drenaje ventricular tras la ReNx.** En la figura se representan las pendientes obtenidas de la regresión entre la tasa de aCSF infundido y la IVP alcanzada, para cada grupo experimental bajo las condiciones indicadas en la gráfica (A, C, E y G). Los gráficos de barras muestran el análisis comparativo de las IVP alcanzadas a una tasa de infusión de 14 µl/min en los grupos indicados (B, D, F y H). Se puede apreciar que en los ratones jóvenes (wt o AQP4<sup>-/-</sup>) la capacidad de drenaje no cambia en ninguna de las condiciones experimentales; mientras, en los animales viejos, la recuperación de la capacidad de drenaje sólo ocurre en los ratones AQP4<sup>-/-</sup> (G y H). En los ratones wt viejos, la capacidad de evacuar el LCR permanece disminuida tras exponerse a ReNx (C y D). Los datos están representados como la media ± S.E.M. Número de animales analizados en cada grupo experimental n= 5 – 12. \*  $p < 0,05$ .

### **3.2. La hipoxia produce una disminución permanente de la capacidad de drenaje del líquido cefalorraquídeo y de la distensibilidad ventricular en ratones envejecidos.**

Mediante test de infusión, estudiamos si la capacidad de evacuación de CSF se mantenía afectada, o no, tras la eliminación del estímulo hipóxico, estableciendo un período de ReNx. Usando la misma metodología descrita en apartados anteriores, analizamos las pendientes obtenidas de las representaciones de presión-flujo para caudales crecientes de  $\alpha$ CSF infundido y se compararon las medidas en las tres condiciones experimentales de interés, en Nx, en Hx y tras un período de 30 días de ReNx. Como se mostró en el trabajo anterior la Hx en combinación con el envejecimiento conlleva a una peor capacidad de drenaje del CSF. Este proceso parece ser independiente de AQP4 ya que dicha disminución en la capacidad de drenaje del CSF ocurre tanto en los animales viejos wt como AQP4<sup>-/-</sup> sometidos a Hx. Pudimos observar, tras los 30 días de ReNx, que la menor capacidad de evacuación observada en los ratones viejos sometidos a Hx es permanente, no recuperándose tras la ReNx (**Figura 12C y D**). Sorprendentemente, los ratones AQP4<sup>-/-</sup> envejecidos sí recuperan la capacidad de drenaje del CSF tras el periodo de ReNx (**Figura 12G y H**). Finalmente, los animales jóvenes, tanto wt como AQP4<sup>-/-</sup>, no presentaron alteraciones significativas en la evacuación del CSF en ninguna de las distintas condiciones experimentales estudiadas (Nx, Hx y ReNx; **Figura 12A, B, E y F**).

Además del análisis de la capacidad de drenaje del CSF, se estudió la distensibilidad, o complianza, del sistema ventricular cerebral frente a un exceso de volumen de  $\alpha$ CSF introducido. Para ello, tal y como se describe en los apartados anteriores, se midió el incremento de presión ( $\Delta P$ ) producido tras la infusión de 1,75  $\mu$ l de  $\alpha$ CSF. Trabajos anteriores en el laboratorio [76] habían mostrado que con el envejecimiento se produce una disminución en la complianza del sistema ventricular, y que la Hx en animales viejos potencia este efecto, mostrando los animales viejos sometidos a Hx, ya sean wt o AQP4<sup>-/-</sup>, una disminución significativa de la distensibilidad ventricular. Este mismo efecto se aprecia en los animales analizados en este grupo de experimentos (**Figura 13B y D**). De forma similar a lo observado para el drenaje del CSF, al analizar los ratones wt viejos tras ReNx, se observó que la menor complianza ventricular inducida por Hx es permanente, sin que se evidencie recuperación tras los 30 días de ReNx. Sin embargo, los ratones AQP4<sup>-/-</sup> viejos, que no habían desarrollado ventriculomegalia durante el estímulo hipóxico, si recuperan la capacidad distensible de su sistema ventricular, volviendo al valor basal tras el período de ReNx. En los animales jóvenes

wt y AQP4<sup>-/-</sup>, no se encontraron alteraciones significativas en este parámetro bajo ninguna de las condiciones experimentales mencionadas (Figura 13A y C).

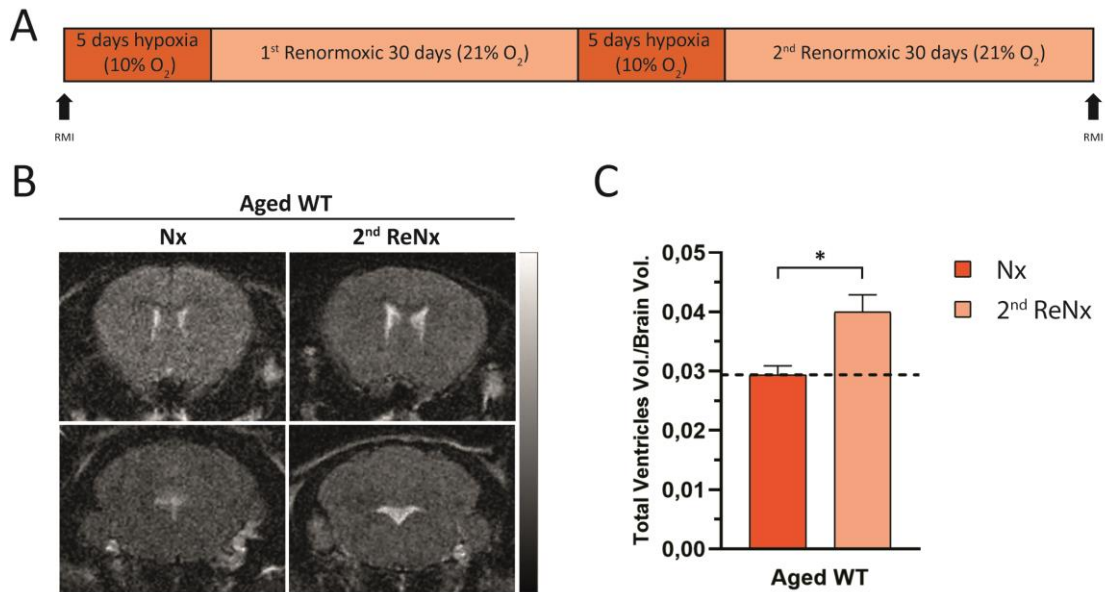


**Figura 13. Cambios de la distensibilidad del sistema ventricular cerebral tras la ReNx.** Se representa un análisis cuantitativo de la  $\Delta P$  de cada grupo experimental bajo las distintas condiciones de Nx, Hx y ReNx, tras la infusión en 15 segundos de 1,75  $\mu$ l de aCSF. Apréciase que la complianza se mantiene disminuida en el modelo wt viejo tras el período renormóxico, a diferencia de lo que ocurre en los AQP4<sup>-/-</sup> viejos, que se recupera. Los datos están representados como la media  $\pm$  S.E.M. Número de animales analizados en cada grupo experimental n= 5 – 11. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

El análisis conjunto de los datos obtenidos acerca de la capacidad de drenaje de CSF y de la distensibilidad ventricular revela dos aspectos de gran interés. Por un lado, los resultados obtenidos en ratones wt ponen de manifiesto que el deterioro de ambos parámetros inducido por el estímulo hipóxico en animales envejecidos, es irreversible. En cambio, los datos recogidos de los animales AQP4<sup>-/-</sup> indican que la ausencia de dicha proteína hace que el empeoramiento de la capacidad de evacuación del CSF y la disminución en la distensibilidad ventricular pasen a ser un proceso reversible tras la eliminación de la condición hipóxica, sugiriendo que AQP4 desempeña un papel en la cronificación de este fenómeno, aunque por ahora es desconocido.

### **3.3. Episodios sucesivos de hipoxia producen ventriculomegalia crónica.**

Se ha demostrado anteriormente que la exposición de animales wt viejos a un evento hipóxico produce una situación de hidrocefalia, con ventriculomegalia, aumento de la IVP y deterioro cognitivo, y que se restaura tras el restablecimiento de la situación de Nx. No obstante, además de estas alteraciones de carácter reversible, la exposición a dicho evento hipóxico también produce una significativa disminución de la capacidad de drenaje de CSF y de la distensibilidad ventricular que no se recuperan, aunque se restablezca la Nx. Por tanto, dado que los ratones wt viejos que han estado sometidos a Hx tienen un deterioro permanente de la capacidad de drenaje del CSF y en la distensibilidad ventricular, nos preguntamos si eventos hipóxicos sucesivos, que conllevarían un aumento del flujo sanguíneo cerebral y de la producción del CSF, podrían conducir a una cronificación del estatus hidrocefálico. Para ello, como se muestra en la **Figura 14A**, se diseñó un protocolo experimental en el que animales wt viejos tras un primer período hipóxico de 5 días al 10% de O<sub>2</sub>, y de ReNx de 30 días, fueron sometidos a un segundo ciclo de 5 días de Hx en las mismas condiciones, y otro de ReNx de 30 días. Fue interesante encontrar que la situación de ventriculomegalia producida por la segunda exposición a Hx se mantenía, aún tras haber vuelto a la situación de Nx (2nd ReNx) tras 30 días. Es decir, un segundo evento hipóxico produce una ventriculomegalia que ya no se recupera por una re-exposición a la condición de Nx (**Figura 14B y 14C**).



**Figura 14. Análisis por MRI de los cambios en el volumen ventricular cerebral tras dos períodos de Hx intermitente.** (A) Cronograma que muestra el protocolo experimental seguido en el grupo de estudio (animales wt viejos). Los ratones fueron sometidos a dos períodos completos de 5 días de Hx al 10% O<sub>2</sub>, seguidos de 30 días de vuelta a la Nx (ReNx). (B) MRI de secciones coronales de estos ratones, al inicio del protocolo experimental, en Nx, y tras la segunda ReNx. (C) Cuantificación del volumen ventricular cerebral. Nótese que la ventriculomegalia desarrollada tras un segundo período hipóxico no se recupera, pese a someterse a los ratones a ReNx. Los datos están representados como la media  $\pm$  S.E.M. Número de animales analizados en cada grupo experimental n= 4 – 5. \*  $p < 0,05$ .



## DISCUSIÓN

---



## DISCUSIÓN

Desde que fueran identificadas las acuaporinas a principios de la década de los 90, quedó bien establecida su implicación en el trasiego de agua a través de las membranas celulares de epitelios y endotelios. Desde entonces, se han descrito nuevas funciones, localizaciones y formas de regulación de la expresión de estas proteínas, destacando, en los últimos años, numerosos estudios que las relacionan con la homeostasis de los fluidos cerebrales [152-155]. AQP1 y AQP4 son los principales canales de transporte de agua en el CNS y, según la concepción "clásica", el CSF se produce principalmente en el CP, donde la secreción de agua es facilitada por AQP1 [92,93,156]. Sin embargo, recientes estudios han evidenciado que una cantidad significativa de CSF se produce como consecuencia de la filtración del agua desde los capilares del parénquima cerebral, facilitado por AQP4 [111,157]. Por ello, es actualmente objeto de debate comprender cómo participan las acuaporinas cerebrales en la homeostasis del CSF.

En este escenario, los primeros estudios realizados en el laboratorio y que se incluyen en este trabajo de tesis, tenían por objetivo conocer cuál era la contribución específica de AQP1 y AQP4 en procesos fundamentales vinculados a la homeostasis del CSF, como son el llenado de los ventrículos, la dinámica de evacuación y la distensibilidad ventricular. Para ello, fue de gran importancia contar con colonias de ratones mutantes que carecían de la expresión de *Aqp1* (AQP1<sup>-/-</sup>), de *Aqp4* (AQP4<sup>-/-</sup>), o de ambas acuaporinas (doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>). De acuerdo con la participación de ambas acuaporinas cerebrales en el llenado ventricular, los ratones doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup> mostraron un volumen ventricular más bajo que los mutantes de AQP1<sup>-/-</sup> y AQP4<sup>-/-</sup>, por separado,

aunque presentaron valores similares de IVP. Estas observaciones sugieren que tanto la AQP1 coroidal como por la AQP4 astroglial y endotelial contribuyen a la producción del CSF y en el llenado ventricular para mantener la IVP en valores fisiológicos.

De acuerdo con resultados previos reportados en el laboratorio del Dr. Verkman para mutantes de AQP1<sup>-/-</sup> [93], y por nuestro grupo para ratones AQP4<sup>-/-</sup> [76], la capacidad de drenaje del CSF en ambos modelos animales no presentaban alteraciones significativas respecto a los ratones wt. Por otro lado, los resultados obtenidos en el mutante doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup>, indican que ambas proteínas podrían participar, directa o indirectamente, como vías de salida del CSF. Históricamente, el aclaramiento de fluidos, aunque también de solutos, ha sido menos estudiado que los procesos de entrada hacia el cerebro. Actualmente, hay un interés aumentado en su estudio, dada su participación en la eliminación de macromoléculas del CNS, contribuyendo, su deterioro, potencialmente a la patogénesis de afecciones neurológicas asociadas a la edad. Estudios recientes han mejorado el conocimiento que se tenía de las vías de drenaje del CSF, por ejemplo, al describirse la existencia de válvulas en los vasos linfáticos meníngeos cervicales, a diferencia de los dorsales [158]; o cómo procesos neuroinflamatorios son capaces de afectar a la dinámica de evacuación del CSF a través de la placa cribiforme y los vasos linfáticos nasales, pero no así de los meníngeos [159]. Sin embargo, aún se desconoce la implicación que pueden tener las acuaporinas cerebrales en estas vías clásicas de drenaje del CSF, por lo que son necesarias nuevas investigaciones para comprender e identificar dónde y cómo AQP1 y AQP4 contribuyen a este proceso. No obstante, se hace necesario considerar también la posibilidad de que se produzca un drenaje accesorio por las propias vías de producción del CSF, tal y como demuestran las investigaciones realizadas por el Dr. Eide, al observar la reabsorción de gadobutrol, inyectado intratecalmente como agente de contraste, a través de los CP [160]. En esta línea, algunos estudios han evidenciado que un cambio en la polaridad de AQP1 y otros cotransportadores iónicos, desde la membrana apical de los CP a la basolateral y al citoplasma, pueden estar involucrados en fenómenos de reabsorción del CSF [161], como así se ha observado en casos de hidrocefalia obstructiva [162].

El análisis de los datos de complianza realizados en los ratones doble KO-AQP1<sup>-/-</sup>:AQP4<sup>-/-</sup> reveló que, ambas acuaporinas podrían modificar la distensibilidad del sistema ventricular, aunque el mecanismo molecular nos es todavía desconocido. Serán necesarios estudios experimentales adicionales para comprender si el volumen ventricular reducido podría estar relacionado con esta alteración, o si la ausencia de las principales acuaporinas cerebrales modifica las propiedades biofísicas del parénquima cerebral; o incluso, si esta modificación

podiera estar asociada con alteraciones sistémicas que potencialmente modifiquen el flujo sanguíneo cerebral y alteren secundariamente la complianza cerebral.

Los datos recientemente publicados por Ilif et al. [142], indican que la AQP4 astroglial perivascular facilita la salida del CSF desde los espacios para-arteriales subaracnoideos al parénquima cerebral, y el aclaramiento del ISF resultante, mediante su entrada en el espacio para-venoso (VRS). Las diferencias de presión entre los extremos arteriales y venosos impulsarían el líquido y favorecerían la eliminación de proteínas y solutos del CNS de manera similar a un sistema linfático, es decir, a través del llamado "sistema glinfático" [142,163], y dada la abundante expresión paravascular de AQP4, esta proteína podría participar en el flujo de agua entre CSF – ISF [124,142,164]. Se ha postulado, entonces, que una significativa producción de CSF por filtración desde los capilares cerebrales es mediada por AQP4, y que proporcionalmente debe ser mucho mayor que la que tiene lugar solo por los CP [157,165]. En esta línea, los resultados aquí presentados indican claramente que la AQP4 expresada en glía y epéndima facilita la formación del CSF, teniendo una contribución independiente y adicional a la secreción mediada por la AQP1 expresada en los CP. Estas observaciones son compatibles con la recientemente formulada "hipótesis de Bulat-Klarica-Oreskovic" [165], y están de acuerdo con las investigaciones de Igarashi et al., quienes reportaron que, tras la inyección intravenosa de  $H_2^{17}O$ , la entrada de agua en el cerebro es realizada por AQP4, y no por AQP1 [111]. Sin embargo, los resultados obtenidos de los ratones mutantes de AQP1<sup>-/-</sup>, también implican una participación significativa del CP en la producción del CSF y en el mantenimiento de la IVP [93], en contraste con trabajos anteriores que cuestionan la participación de los CP en la regulación del CSF [157]. Por último, los datos analizados sugieren que las principales acuaporinas cerebrales, AQP1 y AQP4, podrían modificar la dinámica de evacuación del CSF y la distensibilidad ventricular, aunque aún queda por determinar la localización y función específica de estas acuaporinas en las rutas de drenaje clásicas y en la recientemente identificada, linfática meníngea. Se deben emprender nuevos análisis para obtener una mejor comprensión del mecanismo preciso por el cual la ausencia de expresión de AQP1 y AQP4 puede modificar las propiedades estructurales del parénquima cerebral.

Es necesario destacar que, además de AQP1 y AQP4, otras dos acuaporinas expresadas en el CNS, AQP9 y AQP11, podrían participar también en la homeostasis del CSF. Si bien su función está menos estudiada, el análisis de los datos por *single-cell RNA sequencing* del patrón de expresión génica de las acuaporinas cerebrales (**Tabla 2**), revela dos hechos importantes sobre el papel de AQP9 y AQP11: (1) Pese a que la expresión de AQP9 está muy restringida a la línea astroependimaria, esta es muy baja en comparación con AQP4, lo que

puede sugerir una menor participación en la homeostasis del CSF, y que presente un rol más vinculado al metabolismo energético cerebral, como ya han planteado otros autores [62,166,167]. (2) La expresión de AQP11 está más ampliamente distribuida en los distintos tipos celulares analizados, pero se revela un dato muy interesante del mismo: hay una expresión significativa en endotelio vascular arterial, venoso y en pericitos (clústeres celulares #254, #257 y #260). Así, se sugiere que AQP11 puede tener una participación relevante en la homeostasis del CSF como un componente más del sistema glinfático. Sin embargo, y al margen de estas observaciones, es necesario más trabajo experimental para esclarecer con precisión la función de estas dos acuaporinas en la homeostasis del CSF.

Las acuaporinas cerebrales, por su función y localización, además de participar en la absorción y producción del CSF, como se ha explicado anteriormente, se han relacionado con los cambios en la dinámica de fluidos que están asociados a diversas patologías neurodegenerativas, neurovasculares y neuroinflamatorias. Numerosos estudios justifican que la etiología de las mismas radica en las alteraciones en la producción, el movimiento o el drenaje del CSF, y que conducen a su acumulación en el espacio ventricular y subaracnoideo [60,138,168,169], como ocurre, por ejemplo, en la hidrocefalia. Aunque los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a esta enfermedad son aún desconocidos, parece lógico pensar que cambios en la expresión de las acuaporinas en el CNS, y deslocalización de las mismas, podrían alterar la homeostasis del CSF causando o agravando la condición hidrocefálica. En este sentido, trabajos previos han demostrado la regulación de la expresión de las acuaporinas mediante el uso de diversas metodologías experimentales al producir isquemia, incluida lesiones por traumatismo cerebral y la oclusión de la arteria cerebral [170,171], o simplemente por exposición de los animales a una baja tensión de oxígeno [36,77,79,172], y con la edad [144]. Con este enfoque, se dedicó un importante esfuerzo en el laboratorio a explorar si existía alguna relación entre la Hx, las acuaporinas y la hidrocefalia asociada al envejecimiento.

En primer lugar, analizamos cómo las acuaporinas modifican su expresión en respuesta a la Hx crónica y si, al mismo tiempo, se produce un aumento en el volumen ventricular, como un indicador indirecto de la mayor producción de CSF. De acuerdo con la idea "clásica", cabría esperar que si la Hx afectara notablemente a la expresión de AQP1, al desempeñar un papel fundamental en la producción del CSF [157], se produciría, entonces, un aumento importante en su secreción. Sin embargo, como se ha indicado al inicio de la discusión, este proceso no es exclusivo de AQP1, y cuenta con la importante participación de AQP4. Resultados mostrados en la presente tesis indican que, aunque la Hx condujo a un ligero aumento en la expresión de ambas acuaporinas en animales jóvenes, el único incremento significativo observado fue en

AQP4. En efecto, AQP1 es la acuaporina más abundantemente expresada en el CP en Nx. Sin embargo, y mientras que los niveles de AQP1 permanecieron casi invariables bajo Hx crónica, AQP4 pasó de ser apenas detectable, a ser una proteína con una expresión moderada en el CP. En corteza cerebral, solo se observó un aumento transitorio de la expresión de AQP4 después de 2 días de Hx. Un efecto similar se había reportado anteriormente [79], sugiriendo que la Hx produce una inducción temprana y transitoria de la expresión de mRNA de AQP4, resultando en un incremento de esta acuaporina durante los primeros 2 días. Sin embargo, cuando la situación hipóxica se mantiene por más tiempo, los niveles tienden a volver a valores similares a los encontrados en la Nx.

El análisis de los cambios de expresión de las acuaporinas en el CP y otros tejidos, como células adyacentes a la vasculatura cerebral, la BBB y células ependimarias que bordean el sistema ventricular, hacía pensar que estas podían estar involucradas en el incremento en el volumen ventricular que tiene lugar en la Hx, probablemente debido a un aumento en la producción del CSF. Esto llevó a plantearnos, ¿cómo puede contribuir la Hx a un mayor llenado ventricular y, de ser así, por ende, a la condición hidrocefálica?, y ¿de qué manera participan las acuaporinas en este proceso? De forma equivalente a la hiperemia o aumento local del flujo sanguíneo que tiene lugar en un órgano tras un período de isquemia [173,174], en el cerebro se produce una mayor perfusión sanguínea en Hx como mecanismo compensatorio para asegurar el suministro de oxígeno. Es por ello que se propone que, el aumento en la producción de CSF observado en la Hx es consecuencia directa de una mayor filtración del plasma, debido al aumento de la presión hidrostática por el mayor flujo sanguíneo cerebral. La sobreexpresión de AQP4 observada en el CP inducida por la Hx, ciertamente, contribuirá al aumento en la filtración que ocurre durante la respuesta hiperémica. Sin embargo, cabría esperar que la mayor parte se produzca a partir del endotelio vascular en el parénquima cerebral, dado que abarca una superficie capilar mucho más extensa que la de los CP [165]. El ISF alcanzaría, entonces, el compartimento del CSF a través de la AQP4 presente en los pies de astrocitos pericapilares, de la piamadre y de las células ependimarias. En conjunto, los resultados aquí mostrados, y los reportados previamente por Ilif et al. [142], nos permiten proponer a AQP4 como un objetivo terapéutico clave, cuya inhibición puede ser deseable en formas de hidrocefalia que impliquen una sobreproducción de CSF, como las que resultan de condiciones hipóxicas o isquémicas.

Deben destacarse las semejanzas halladas entre las manifestaciones clínicas de la hidrocefalia idiopática normotensiva (INPH) y los síntomas principales derivados del estado hidrocefálico inducido en animales de edad avanzada por Hx crónica: aumento del tamaño de

la cavidad ventricular, aumento moderado de la IVP, alteraciones en la distensibilidad del parénquima cerebral y déficits cognitivos [175]. Es por ello que consideramos que los ratones envejecidos sometidos a tratamiento de Hx crónica pueden ser un excelente modelo experimental para estudiar las características fisiopatológicas de la iNPH, y las posibles opciones terapéuticas para esta enfermedad.

La ventriculomegalia desarrollada tras la Hx en el modelo de animal wt viejo contrasta con una cavidad ventricular sin cambios aparentes en los ratones AQP4<sup>-/-</sup> viejos, y es probablemente el resultado de una combinación de dos factores. En primer lugar, un incremento en la producción de CSF está estrechamente relacionado con el aumento del flujo sanguíneo bajo Hx crónica [176-179], y se ve facilitada por la mayor cantidad de AQP4 que se encuentra en la corteza cerebral y en el CP en animales de edad avanzada. En segundo lugar, pero no menos importante, una menor capacidad de drenaje del CSF, y distensibilidad ventricular alterada, se asocian con el envejecimiento, y se ve exacerbada en combinación con la Hx. En este sentido, nuestros resultados, y los de otros autores, mantienen firmemente la idea de que un sistema de evacuación del CSF disfuncional, contribuye a un estatus hidrocefálico. Se ha observado la deslocalización y expresión alterada de AQP4 en podocitos perivasculares de astrocitos corticales en cerebros de edad avanzada, tanto en humanos [144], como en otros animales [180], y ambos están asociados con una reducción en la capacidad de drenaje del CSF. Consistente con estas evidencias, nuestros datos reflejan que la astrogliosis más importante se observa en la corteza cerebral de los animales envejecidos tras Hx crónica, y está asociada con una deslocalización perivascular de AQP4 y un peor drenaje del CSF.

El aumento en la producción de CSF solo estuvo acompañado de una elevación del valor de IVP en los modelos de edad avanzada tras ser sometidos a Hx. Particularmente, en estos animales, una peor capacidad de evacuación del CSF, menor distensibilidad de su sistema ventricular, y/o deterioro en el funcionamiento del sistema glinfático, contribuirían a la pronunciada ventriculomegalia y al elevado registro de IVP. Asimismo, se han reportado en humanos efectos similares en el detrimento en la evacuación del CSF por fibrosis de las granulaciones aracnoideas asociada a la edad [181,182].

Sospechamos que el déficit cognitivo observado tras la Hx en ratones envejecidos puede estar asociado a la disminución de la perfusión sanguínea cerebral que tiene lugar ante una elevación de la IVP, tal y como predice la hipótesis de Monro-Kellie [183]. Además, la propia compresión mecánica de los circuitos neuronales esenciales para la consolidación de la memoria, debido al edema y a la ventriculomegalia, puede favorecer también el deterioro



cognitivo. Más aún, las alteraciones en el sistema glinfático y un reducido drenaje del CSF, podrían estar también relacionadas con estos déficits cognitivos [142,143]. En este sentido, el grupo del Dr. Eide ha reportado, mediante MRI de contraste con gadobutrol, un aclaramiento glinfático reducido en pacientes con iNPH, y ha sugerido que la demencia en estos pacientes puede estar asociada con una función glinfática deteriorada [68]. Además, se ha propuesto que el envejecimiento, las lesiones cerebrales y los procesos neuroinflamatorios estén asociadas con una gliosis reactiva que puede afectar a la vía glinfática, ralentizando la eliminación de proteínas del CSF y metabolitos tóxicos desde el intersticio cerebral, lo que contribuye a sentar las bases para el desarrollo del deterioro cognitivo observado en las fases crónicas de pacientes con AD [142,144,184].

Los resultados del presente trabajo demuestran, por vez primera, que la Hx y el envejecimiento actúan sinérgicamente para producir hidrocefalia en ratones, y que son tres los elementos que contribuyen decisivamente a este efecto: (i) mayor expresión, pero desorganizada, de canales de AQP4, (ii) aumento en la filtración de CSF por la respuesta hiperémica local inducida por la Hx, y (iii) combinación de una menor tasa de evacuación de CSF y menor distensibilidad cerebral. Actualmente, las opciones de tratamiento para la hidrocefalia implican la intervención quirúrgica para insertar una válvula de drenaje, o la derivación periódica mediante punción lumbar, del exceso de CSF que causa una elevación de la IVP, ambos, con numerosos riesgos inherentes asociados. Nuestros resultados plantean la posibilidad de desarrollar un abordaje farmacológico con el objetivo de regular el flujo de agua cerebral a través de los canales de AQP4 que represente una alternativa viable para ayudar a tratar la hidrocefalia junto con los métodos quirúrgicos actuales, o como monoterapia cuando la cirugía esté contraindicada. La búsqueda de agentes terapéuticos dirigidos a bloquear a AQP4 presenta la dificultad de identificar compuestos que sean selectivos y funcionales, con baja toxicidad y adecuada biodisponibilidad para ser activo en el SNC. Por ejemplo, los iones metálicos, si bien han demostrado su efectividad, resultan tóxicos para ser implementados en la práctica clínica. Algunos compuestos orgánicos se han propuesto como potentes inhibidores de AQP4, entre ellos, fármacos para el tratamiento de la epilepsia (fenitoína, zonisamida, lamotrigina o topiramato), de la migraña (sumatriptán) y moduladores del estado anímico como antidepresivos y para el trastorno bipolar. Sin embargo, diversos estudios han revelado que la mayoría de estos compuestos apenas lograban un 50% de inhibición [185-187]. La acetazolamida, en cambio, ha confirmado ser un eficaz inhibidor del flujo de agua a través de AQP4 [188], y se ha utilizado en diferentes afecciones hidrocefálicas [189], incluidos pacientes con iNPH, con claros efectos beneficiosos [190,191]. Recientemente, se ha evaluado la eficacia

del compuesto TGN-020 en modelos de ratón a los que se les induce un daño isquémico por oclusión de la arteria medial cerebral. El pretratamiento en una única dosis por vía intraperitoneal con TGN-020, ha demostrado una reducción significativa del tamaño del edema, así como la inflamación astrocitaria y posterior gliosis asociada, proceso en el cual AQP4 juega un papel fundamental, como ya se ha indicado anteriormente [128,129]. Este compuesto parece ser capaz de modular la actividad de AQP4, habiéndose demostrado su selectividad, inhibición funcional y accesibilidad al SNC, aunque aún no se ha podido establecer una concentración terapéutica para una dosificación sostenida [192-194]. Siguen siendo necesarias investigaciones adicionales para identificar nuevos agentes capaces de modular con eficacia a AQP4 con los mínimos efectos adversos para que puedan ser útiles en el tratamiento de la hidrocefalia a nivel molecular sin la necesidad de intervención quirúrgica.

Finalmente, algunos de los síntomas que se manifiestan en la iNPH, como son el deterioro cognitivo, la incontinencia urinaria y la apraxia, generalmente de la marcha (conocidos en la práctica clínica como tríada de Hakim-Adams), son reversibles, permitiendo al paciente mejorar, transitoria y parcialmente, tras una derivación o punción lumbar [195]. Esta recuperación corresponde, de hecho, a la evacuación del exceso de volumen del CSF localizado en una cavidad que ha sufrido una ventriculomegalia por la sobrepresión que ha soportado. Tras haber demostrado que el establecimiento de una condición hipóxica tiene un papel destacado en el inicio de la iNPH [76], nos cuestionamos si, en nuestro modelo experimental, tras la eliminación de la Hx, evidenciaríamos alguna mejoría en las alteraciones fisiológicas previamente descritas o si, por el contrario, estas perdurarían en el tiempo.

En la práctica hospitalaria, los pacientes de iNPH son diagnosticados de acuerdo a un conjunto de criterios, entre los que destacan aquellos basados en los cambios medidos por MRI en el volumen de los compartimentos donde se aloja el CSF, como el índice de Evans, o la presencia de un patrón “DESH” (“*disproportionately enlarged subarachnoid-space hydrocephalus*”) [195,196]. Así, el aumento de volumen ventricular es una de las evidencias más claramente identificables en la iNPH, por lo que parecía lógico que, si tras la eliminación del estímulo hipóxico se producía una mejora en la condición hidrocefálica en nuestro modelo experimental, observaríamos una recuperación en el parámetro fisiológico más directamente relacionado con la ventriculomegalia, es decir, con el llenado ventricular. En efecto, el análisis mediante MRI reveló que los animales wt recuperaban el volumen ventricular tras 30 días de permanencia en condiciones de ReNx. Análogamente, los registros de IVP mostraron una tendencia similar, al reestablecerse a valores comprendidos en el rango fisiológico previo al estímulo hipóxico. Este efecto ya había sido propuesto antes por Monro y Kellie, por ser el

cráneo un sistema rígido y cerrado, existiría un equilibrio entre los volúmenes de CSF y de flujo sanguíneo cerebral, por lo que cambios en uno de ellos tendría un efecto recíproco en el otro. Cuando esto no fuera posible, un aumento de volumen adicional conduciría a un aumento de la IVP [197]. Por el mismo principio, tras eliminar el factor hipóxico y retornar a un estado de oxigenación normal, una menor perfusión sanguínea cerebral llevará asociada consigo una reducción en los volúmenes de CSF ventricular, y con ello, una menor IVP, como revelan nuestros resultados. En concordancia con los datos de MRI y IVP, tras el período de ReNx, los resultados conductuales revelaron la importancia que tiene la reversión de la ventriculomegalia severa desarrollada en los ratones wt viejos para la restauración de una función cognitiva normal.

Si tomamos en conjunto los datos de drenaje y complianza, ambos empeoran por igual en los modelos de animales envejecidos (wt y AQP4<sup>-/-</sup>) cuando son sometidos a Hx, por lo que la alteración de estos dos parámetros parece estar más asociada con el envejecimiento, y su afectación parece ser independiente de AQP4. Sin embargo, observamos que la reversión a valores basales (previos a la hipoxia) de los parámetros de complianza y drenaje sólo tiene lugar en el ratón AQP4<sup>-/-</sup> viejo, mientras que en el wt viejo permanecen alterados. Parece evidente pensar que esta recuperación está directamente condicionada por la ventriculomegalia: si esta se produce, como ocurre en el animal wt, la alteración en el drenaje y la complianza no se recuperan; pero si la hipoxia no produce ventriculomegalia, como sucede en el modelo AQP4<sup>-/-</sup> viejo, se recuperan dichos parámetros. Podemos decir, por tanto, que independientemente de que haya o no ventriculomegalia, la Hx modifica el drenaje y la complianza en animales wt y AQP4<sup>-/-</sup>; aunque, si la ventriculomegalia llega a producirse, una situación de ReNx no lograría que se recuperen estos parámetros en el animal wt, evidenciando un daño definitivo del sistema de evacuación del animal. Es decir, el haber padecido una ventriculomegalia hace que el sistema de drenaje y la capacidad distensible del sistema no se recuperen. No obstante, la reversión que acabamos de describir que ocurre en el ratón AQP4<sup>-/-</sup> viejo en los parámetros de drenaje y complianza tras un período de ReNx, pudiera tener otra explicación distinta y no relacionada a la ventriculomegalia. Podríamos pensar por ejemplo, que la no restauración de la capacidad de drenaje y complianza en el animal wt viejo pueda deberse a que se estén dando cambios celulares ligados a AQP4, como una gliosis masiva, ya reportada previamente [76,198-201], y que estos cambios perduren en la situación de ReNx.

En el presente trabajo se ha demostrado que, tras la exposición de ratones de edad avanzada a un evento hipóxico, se produce una situación de hidrocefalia, caracterizado por

ventrículos cerebrales agrandados, aumento de la IVP y deterioro cognitivo, y que son reversibles tras el restablecimiento de la situación normóxica. Sin embargo, otras alteraciones que cursan con el desarrollo de la hidrocefalia, como son la disminución en la capacidad de drenaje y en la distensibilidad ventricular, no se recuperan, aunque se restablezca la Nx. Trasladando estos resultados a tratar de entender la etiología y el desarrollo de la iNPH, supondría que eventos de Hx repetitivos a lo largo de la vida podrían ir condicionando a un peor pronóstico en el curso de la enfermedad. En efecto, pudimos constatar que la ventriculomegalia desarrollada tras un segundo período hipóxico no se recupera, incluso tras haber vuelto a la situación de Nx, por segunda vez.

Pese a definirse como una patología de etiología desconocida, existen múltiples condicionantes que están frecuentemente asociados al establecimiento de la iNPH. Estudios poblacionales han demostrado que casi un 25% de los pacientes diagnosticados de iNPH cursan con uno o más factores de riesgo cardiovasculares, entre hipertensión arterial, hiperlipidemia, diabetes, obesidad, sedentarismo, enfermedades vasculares periféricas y cerebrales, así como factores psicosociales [202,203]. Paralelamente, se ha manifestado que hasta un 50% de la población mayor de 65 años ha estado expuesto, o padecido, a lo largo de su vida, al menos, alguno de los siguientes factores de riesgo respiratorios: síndrome de apnea/hipoapnea obstructiva del sueño (SAHOS), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), tabaquismo crónico y exposición a humos, polvos y contaminantes ambientales [204,205].

Posiblemente, en los animales wt viejos los cambios que ocurren hacia el deterioro de su capacidad de drenaje y su complianza tras la primera exposición a Hx, los cuales no se recuperan con el período de ReNx, unidos al incremento en la formación de CSF de un segundo evento hipóxico sean suficientes para explicar que se desarrolle una ventriculomegalia permanente. Adicionalmente, la exposición a lo largo de la vida a alguno de los condicionantes anteriormente referidos, es susceptible de generar episodios recurrentes de Hx que produzcan un deterioro aún mayor de la capacidad de drenaje de CSF y de la distensibilidad ventricular, conduciendo así a un estatus hidrocefálico con una ventriculomegalia mayor e irreversible.

## **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes que resultan de esta tesis doctoral son:

1. Tanto la AQP1 coroidal como la AQP4 astrogial y ependimaria participan en la producción del líquido cefalorraquídeo y en el llenado ventricular, y contribuyen así a mantener la presión intraventricular en valores fisiológicos.
2. La ausencia de AQP1 o AQP4, por sí solo, no es suficiente para alterar sustancialmente la capacidad de drenaje o la distensibilidad del sistema ventricular. Sin embargo, la carencia simultánea de ambas proteínas claramente modifica estos procesos, indicando la participación de AQP1 y AQP4 en ellos.
3. La hipoxia regula fundamentalmente la expresión de AQP4 en las células epiteliales de los plexos coroideos y en los astrocitos pericapilares de la corteza cerebral, y no así la expresión de AQP1 en cerebro. Estos mismos cambios están también asociados con el envejecimiento, y se ven exacerbados en combinación con la hipoxia. La sobreexpresión de AQP4 inducida por hipoxia y envejecimiento contribuye al aumento del volumen ventricular cerebral por la mayor producción de líquido cefalorraquídeo.
4. Los animales viejos muestran una elevación de la presión intraventricular tras ser sometidos a hipoxia, condiciones bajo las cuales se evidencia un deterioro cognitivo asociado. Estas alteraciones se deben a un aumento en la producción del líquido cefalorraquídeo mediada por AQP4, ya que el modelo animal de AQP4<sup>-/-</sup> no cursa con ventriculomegalia ni con aumento de la presión intraventricular por hipoxia y/o

envejecimiento, del mismo modo que no manifiestan alteraciones cognitivas observables.

5. Dadas las semejanzas halladas entre las manifestaciones clínicas de la hidrocefalia idiopática normotensiva (iNPH) y los síntomas principales derivados del estado hidrocefálico inducido en animales de edad avanzada por hipoxia crónica, proponemos que el animal viejo expuesto a hipoxia representa un buen modelo para el estudio de las características fisiopatológicas de la iNPH, y de las posibles opciones terapéuticas para esta enfermedad.
6. La eliminación del factor hipóxico y el retorno al estado de oxigenación normal lleva consigo una reducción en el volumen ventricular y una menor presión intraventricular en animales envejecidos, lo que va asociado con la restauración de una función cognitiva normal.
7. En los ratones viejos, la hipoxia causa un deterioro irreversible en la capacidad de drenaje del líquido cefalorraquídeo y en la distensibilidad del sistema ventricular. Este proceso depende de la presencia de AQP4, ya que los ratones AQP4<sup>-/-</sup> sí restablecen estos parámetros a valores similares a los encontrados en normoxia.
8. El deterioro permanente en la capacidad de evacuación del líquido cefalorraquídeo y en la distensibilidad ventricular asociado al envejecimiento, junto con períodos repetitivos de hipoxia conducen al establecimiento de un estatus de hidrocefalia crónica e irreversible.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## BIBLIOGRAFÍA

1. Reuss, L.; Hirst, B.H. Water transport controversies--an overview. *J Physiol* **2002**, *542*, 1-2, doi:10.1113/jphysiol.2002.024109.
2. A., F. Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes: Theory and reality. *John Wiley and Sons Ltd: New York* **1987**, 10.1002/cbf.290060323, 228, doi:10.1002/cbf.290060323.
3. Macey, R.L.; Farmer, R.E.L. Inhibition of water and solute permeability in human red cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1970**, *211*, 104-106, doi:10.1016/0005-2736(70)90130-6.
4. Preston, G.M.; Agre, P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 11110-11114, doi:10.1073/pnas.88.24.11110.
5. Preston, G.M.; Carroll, T.P.; Guggino, W.B.; Agre, P. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* **1992**, *256*, 385-387, doi:10.1126/science.256.5055.385.
6. Fushimi, K.; Uchida, S.; Hara, Y.; Hirata, Y.; Marumo, F.; Sasaki, S. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* **1993**, *361*, 549-552, doi:10.1038/361549a0.
7. Echevarria, M.; Windhager, E.E.; Tate, S.S.; Frindt, G. Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 10997-11001, doi:10.1073/pnas.91.23.10997.
8. Jung, J.S.; Bhat, R.V.; Preston, G.M.; Guggino, W.B.; Baraban, J.M.; Agre, P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 13052-13056, doi:10.1073/pnas.91.26.13052.
9. Raina, S.; Preston, G.M.; Guggino, W.B.; Agre, P. Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 1908-1912, doi:10.1074/jbc.270.4.1908.
10. Carbrey, J.; Agre, P. Discovery of the Aquaporins and Development of the Field. In *Aquaporins*, Beitz, E., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2009; Vol. 190, pp. 3-28.

11. Gonen, T.; Walz, T. The structure of aquaporins. *Q Rev Biophys* **2006**, *39*, 361-396, doi:10.1017/S0033583506004458.
12. Gorin, M.B.; Yancey, S.B.; Cline, J.; Revel, J.-P.; Horwitz, J. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: Characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* **1984**, *39*, 49-59, doi:10.1016/0092-8674(84)90190-9.
13. Fotiadis, D.; Hasler, L.; Muller, D.J.; Stahlberg, H.; Kistler, J.; Engel, A. Surface tongue-and-groove contours on lens MIP facilitate cell-to-cell adherence. *J Mol Biol* **2000**, *300*, 779-789, doi:10.1006/jmbi.2000.3920.
14. Gorelick, D.A.; Praetorius, J.; Tsunenari, T.; Nielsen, S.; Agre, P. Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem* **2006**, *7*, 14, doi:10.1186/1471-2091-7-14.
15. Itoh, T.; Rai, T.; Kuwahara, M.; Ko, S.B.; Uchida, S.; Sasaki, S.; Ishibashi, K. Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *330*, 832-838, doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.046.
16. Ikeda, M.; Andoo, A.; Shimono, M.; Takamatsu, N.; Taki, A.; Muta, K.; Matsushita, W.; Uechi, T.; Matsuzaki, T.; Kenmochi, N., et al. The NPC motif of aquaporin-11, unlike the NPA motif of known aquaporins, is essential for full expression of molecular function. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 3342-3350, doi:10.1074/jbc.M110.180968.
17. Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann, J.B.; Engel, A.; Fujiyoshi, Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* **2000**, *407*, 599-605, doi:10.1038/35036519.
18. Verkman, A.S.; Anderson, M.O.; Papadopoulos, M.C. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13*, 259-277, doi:10.1038/nrd4226.
19. Walz, T.; Smith, B.L.; Zeidel, M.L.; Engel, A.; Agre, P. Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 1583-1586.
20. Zeidel, M.L.; Nielsen, S.; Smith, B.L.; Ambudkar, S.V.; Maunsbach, A.B.; Agre, P. Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes. *Biochemistry* **1994**, *33*, 1606-1615, doi:10.1021/bi00172a042.
21. de Groot, B.L.; Grubmuller, H. The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. *Curr Opin Struct Biol* **2005**, *15*, 176-183, doi:10.1016/j.sbi.2005.02.003.
22. Burykin, A.; Warshel, A. What Really Prevents Proton Transport through Aquaporin? Charge Self-Energy versus Proton Wire Proposals. *Biophysical Journal* **2003**, *85*, 3696-3706, doi:10.1016/s0006-3495(03)74786-9.
23. Sales, A.D.; Lobo, C.H.; Carvalho, A.A.; Moura, A.A.; Rodrigues, A.P. Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation. *Genet Mol Res* **2013**, *12*, 6718-6732, doi:10.4238/2013.December.13.5.
24. Gonen, T.; Cheng, Y.; Sliz, P.; Hiroaki, Y.; Fujiyoshi, Y.; Harrison, S.C.; Walz, T. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQPO crystals. *Nature* **2005**, *438*, 633-638, doi:10.1038/nature04321.
25. Zhang, Y.B.; Chen, L.Y. In silico study of Aquaporin V: Effects and affinity of the central pore-occluding lipid. *Biophys Chem* **2013**, *171*, 24-30, doi:10.1016/j.bpc.2012.09.004.

26. Boassa, D.; Stamer, W.D.; Yool, A.J. Ion channel function of aquaporin-1 natively expressed in choroid plexus. *J Neurosci* **2006**, *26*, 7811-7819, doi:10.1523/JNEUROSCI.0525-06.2006.
27. Wolburg, H.; Wolburg-Buchholz, K.; Fallier-Becker, P.; Noell, S.; Mack, A.F. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int Rev Cell Mol Biol* **2011**, *287*, 1-41, doi:10.1016/B978-0-12-386043-9.00001-3.
28. Smith, A.J.; Jin, B.J.; Ratelade, J.; Verkman, A.S. Aggregation state determines the localization and function of M1- and M23-aquaporin-4 in astrocytes. *J Cell Biol* **2014**, *204*, 559-573, doi:10.1083/jcb.201308118.
29. Walz, T.; Fujiyoshi, Y.; Engel, A. The AQP structure and functional implications. *Handb Exp Pharmacol* **2009**, 10.1007/978-3-540-79885-9\_2, 31-56, doi:10.1007/978-3-540-79885-9\_2.
30. Jarius, S.; Wildemann, B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol* **2010**, *6*, 383-392, doi:10.1038/nrneurol.2010.72.
31. Ikeshima-Kataoka, H. Neuroimmunological Implications of AQP4 in Astrocytes. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17081306.
32. Verkman, A.S. Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert Rev Mol Med* **2008**, *10*, e13, doi:10.1017/S1462399408000690.
33. King, L.S.; Kozono, D.; Agre, P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 687-698, doi:10.1038/nrm1469.
34. Cooper, G.J.; Zhou, Y.; Bouyer, P.; Grichtchenko, II; Boron, W.F. Transport of volatile solutes through AQP1. *J Physiol* **2002**, *542*, 17-29, doi:10.1113/jphysiol.2002.023218.
35. Holm, L.M.; Jahn, T.P.; Moller, A.L.; Schjoerring, J.K.; Ferri, D.; Klaerke, D.A.; Zeuthen, T. NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **2005**, *450*, 415-428, doi:10.1007/s00424-005-1399-1.
36. Echevarria, M.; Munoz-Cabello, A.M.; Sanchez-Silva, R.; Toledo-Aral, J.J.; Lopez-Barneo, J. Development of cytosolic hypoxia and hypoxia-inducible factor stabilization are facilitated by aquaporin-1 expression. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 30207-30215, doi:10.1074/jbc.M702639200.
37. Tsukaguchi, H.; Weremowicz, S.; Morton, C.C.; Hediger, M.A. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am J Physiol* **1999**, *277*, F685-696, doi:10.1152/ajprenal.1999.277.5.F685.
38. Bienert, G.P.; Moller, A.L.; Kristiansen, K.A.; Schulz, A.; Moller, I.M.; Schjoerring, J.K.; Jahn, T.P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 1183-1192, doi:10.1074/jbc.M603761200.
39. Verkman, A.S. Physiological importance of aquaporin water channels. *Ann Med* **2002**, *34*, 192-200.
40. Ma, T.; Yang, B.; Gillespie, A.; Carlson, E.J.; Epstein, C.J.; Verkman, A.S. Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 4296-4299, doi:10.1074/jbc.273.8.4296.
41. Deen, P.M.; Verdijk, M.A.; Knoers, N.V.; Wieringa, B.; Monnens, L.A.; van Os, C.H.; van Oost, B.A. Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine. *Science* **1994**, *264*, 92-95, doi:10.1126/science.8140421.
42. Nielsen, S.; Nagelhus, E.A.; Amiry-Moghaddam, M.; Bourque, C.; Agre, P.; Ottersen, O.P. Specialized membrane domains for water transport in glial cells:

- high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* **1997**, *17*, 171-180.
43. Nagelhus, E.A.; Veruki, M.L.; Torp, R.; Haug, F.M.; Laake, J.H.; Nielsen, S.; Agre, P.; Ottersen, O.P. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* **1998**, *18*, 2506-2519.
44. Manley, G.T.; Fujimura, M.; Ma, T.; Noshita, N.; Filiz, F.; Bollen, A.W.; Chan, P.; Verkman, A.S. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* **2000**, *6*, 159-163, doi:10.1038/72256.
45. Tsubota, K.; Hirai, S.; King, L.S.; Agre, P.; Ishida, N. Defective cellular trafficking of lacrimal gland aquaporin-5 in Sjögren's syndrome. *The Lancet* **2001**, *357*, 688-689, doi:10.1016/S0140-6736(00)04140-4.
46. Yasui, M.; Hazama, A.; Kwon, T.H.; Nielsen, S.; Guggino, W.B.; Agre, P. Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin. *Nature* **1999**, *402*, 184-187, doi:10.1038/46045.
47. Skowronski, M.T.; Lebeck, J.; Rojek, A.; Praetorius, J.; Fuchtbauer, E.M.; Frokiaer, J.; Nielsen, S. AQP7 is localized in capillaries of adipose tissue, cardiac and striated muscle: implications in glycerol metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* **2007**, *292*, F956-965, doi:10.1152/ajprenal.00314.2006.
48. Huebert, R.C.; Splinter, P.L.; Garcia, F.; Marinelli, R.A.; LaRusso, N.F. Expression and localization of aquaporin water channels in rat hepatocytes. Evidence for a role in canalicular bile secretion. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 22710-22717, doi:10.1074/jbc.M202394200.
49. Saporov, S.M.; Liu, K.; Agre, P.; Pohl, P. Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 5296-5301, doi:10.1074/jbc.M609343200.
50. Amiry-Moghaddam, M.; Lindland, H.; Zelenin, S.; Roberg, B.A.; Gundersen, B.B.; Petersen, P.; Rinvik, E.; Torgner, I.A.; Ottersen, O.P. Brain mitochondria contain aquaporin water channels: evidence for the expression of a short AQP9 isoform in the inner mitochondrial membrane. *FASEB J* **2005**, *19*, 1459-1467, doi:10.1096/fj.04-3515com.
51. Ishibashi, K.; Morinaga, T.; Kuwahara, M.; Sasaki, S.; Imai, M. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1576*, 335-340, doi:10.1016/S0167-4781(02)00393-7.
52. Koike, S.; Tanaka, Y.; Matsuzaki, T.; Morishita, Y.; Ishibashi, K. Aquaporin-11 (AQP11) Expression in the Mouse Brain. *Int J Mol Sci* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17060861.
53. Verkman, A.S. Aquaporins at a glance. *Journal of Cell Science* **2011**, *124*, 2107-2112.
54. Shields, S.D.; Mazario, J.; Skinner, K.; Basbaum, A.I. Anatomical and functional analysis of aquaporin 1, a water channel in primary afferent neurons. *Pain* **2007**, *131*, 8-20, doi:10.1016/j.pain.2006.11.018.
55. Arcienega, II; Brunet, J.F.; Bloch, J.; Badaut, J. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience* **2010**, *167*, 1103-1114, doi:10.1016/j.neuroscience.2010.02.059.
56. Zeisel, A.; Hochgerner, H.; Lonnerberg, P.; Johnsson, A.; Memic, F.; van der Zwan, J.; Haring, M.; Braun, E.; Borm, L.E.; La Manno, G., et al. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* **2018**, *174*, 999-1014 e1022, doi:10.1016/j.cell.2018.06.021.

57. He, F.; Sun, Y.E. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 661-665, doi:10.1016/j.biocel.2006.10.022.
58. Wolburg, H.; Noell, S.; Wolburg-Buchholz, K.; Mack, A.; Fallier-Becker, P. Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. *Neuroscientist* **2009**, *15*, 180-193, doi:10.1177/1073858408329509.
59. Li, J.; Verkman, A.S. Impaired hearing in mice lacking aquaporin-4 water channels. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 31233-31237, doi:10.1074/jbc.M104368200.
60. Papadopoulos, M.C.; Verkman, A.S. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **2013**, *14*, 265-277, doi:10.1038/nrn3468.
61. Badaut, J.; Petit, J.M.; Brunet, J.F.; Magistretti, P.J.; Charriaut-Marlangue, C.; Regli, L. Distribution of Aquaporin 9 in the adult rat brain: preferential expression in catecholaminergic neurons and in glial cells. *Neuroscience* **2004**, *128*, 27-38, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.05.042.
62. Badaut, J.; Brunet, J.F.; Petit, J.M.; Guerin, C.F.; Magistretti, P.J.; Regli, L. Induction of brain aquaporin 9 (AQP9) in catecholaminergic neurons in diabetic rats. *Brain Res* **2008**, *1188*, 17-24, doi:10.1016/j.brainres.2007.10.087.
63. Bestetti, S.; Galli, M.; Sorrentino, I.; Pinton, P.; Rimessi, A.; Sitia, R.; Medrano-Fernandez, I. Human aquaporin-11 guarantees efficient transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across the endoplasmic reticulum membrane. *Redox Biol* **2020**, *28*, 101326, doi:10.1016/j.redox.2019.101326.
64. Tornroth-Horsefield, S.; Hedfalk, K.; Fischer, G.; Lindkvist-Petersson, K.; Neutze, R. Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS Lett* **2010**, *584*, 2580-2588, doi:10.1016/j.febslet.2010.04.037.
65. Nedvetsky, P.I.; Tamma, G.; Beulshausen, S.; Valenti, G.; Rosenthal, W.; Klussmann, E. Regulation of aquaporin-2 trafficking. *Handb Exp Pharmacol* **2009**, 10.1007/978-3-540-79885-9\_6, 133-157, doi:10.1007/978-3-540-79885-9\_6.
66. Conner, M.T.; Conner, A.C.; Brown, J.E.; Bill, R.M. Membrane trafficking of aquaporin 1 is mediated by protein kinase C via microtubules and regulated by tonicity. *Biochemistry* **2010**, *49*, 821-823, doi:10.1021/bi902068b.
67. Madeira, A.; Moura, T.F.; Soveral, G. Detecting Aquaporin Function and Regulation. *Front Chem* **2016**, *4*, 3, doi:10.3389/fchem.2016.00003.
68. Garcia, F.; Kierbel, A.; Larocca, M.C.; Gradilone, S.A.; Splinter, P.; LaRusso, N.F.; Marinelli, R.A. The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 12147-12152, doi:10.1074/jbc.M009403200.
69. Kitchen, P.; Salman, M.M.; Halsey, A.M.; Clarke-Bland, C.; MacDonald, J.A.; Ishida, H.; Vogel, H.J.; Almutiri, S.; Logan, A.; Kreida, S., et al. Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. *Cell* **2020**, *181*, 784-799 e719, doi:10.1016/j.cell.2020.03.037.
70. Carbrey, J.M.; Agre, P. Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol* **2009**, 10.1007/978-3-540-79885-9\_1, 3-28, doi:10.1007/978-3-540-79885-9\_1.
71. Noda, Y.; Sohara, E.; Ohta, E.; Sasaki, S. Aquaporins in kidney pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* **2010**, *6*, 168-178, doi:10.1038/nrneph.2009.231.
72. Jung, H.J.; Kwon, T.H. New insights into the transcriptional regulation of aquaporin-2 and the treatment of X-linked hereditary nephrogenic diabetes insipidus. *Kidney Res Clin Pract* **2019**, *38*, 145-158, doi:10.23876/j.krcp.19.002.
73. Umenishi, F.; Schrier, R.W. Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-



- responsive element in the AQP1 gene. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 15765-15770, doi:10.1074/jbc.M209980200.
74. Moon, C.; King, L.S.; Agre, P. Aqp1 expression in erythroleukemia cells: genetic regulation of glucocorticoid and chemical induction. *Am J Physiol* **1997**, *273*, C1562-1570, doi:10.1152/ajpcell.1997.273.5.C1562.
  75. Yang, F.; Kawedia, J.D.; Menon, A.G. Cyclic AMP regulates aquaporin 5 expression at both transcriptional and post-transcriptional levels through a protein kinase A pathway. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 32173-32180, doi:10.1074/jbc.M305149200.
  76. Trillo-Contreras, J.L.; Ramirez-Lorca, R.; Hiraldo-Gonzalez, L.; Sanchez-Gomar, I.; Galan-Cobo, A.; Suarez-Luna, N.; Sanchez de Rojas-de Pedro, E.; Toledo-Aral, J.J.; Villadiego, J.; Echevarria, M. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2018**, *1864*, 3515-3526, doi:10.1016/j.bbadis.2018.08.006.
  77. Abreu-Rodriguez, I.; Sanchez Silva, R.; Martins, A.P.; Soveral, G.; Toledo-Aral, J.J.; Lopez-Barneo, J.; Echevarria, M. Functional and transcriptional induction of aquaporin-1 gene by hypoxia; analysis of promoter and role of Hif-1alpha. *PLoS One* **2011**, *6*, e28385, doi:10.1371/journal.pone.0028385.
  78. Cummins, E.P.; Taylor, C.T. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* **2005**, *450*, 363-371, doi:10.1007/s00424-005-1413-7.
  79. Chen, S.J.; Yang, J.F.; Kong, F.P.; Ren, J.L.; Hao, K.; Li, M.; Yuan, Y.; Chen, X.C.; Yu, R.S.; Li, J.F., et al. Overactivation of corticotropin-releasing factor receptor type 1 and aquaporin-4 by hypoxia induces cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 13199-13204, doi:10.1073/pnas.1404493111.
  80. K., C.E.D. An Illustrated History of Brain Function (Pp. 154; illustrated) Sandford Publications: Oxford. 1972. *Psychological Medicine* **2009**, *3*, 396-396, doi:10.1017/s0033291700049813.
  81. Frederiks, J.A.; Koehler, P.J. The first lumbar puncture. *J Hist Neurosci* **1997**, *6*, 147-153, doi:10.1080/09647049709525699.
  82. Black, P.M. Harvey Cushing at the Peter Bent Brigham Hospital. *Neurosurgery* **1999**, *45*, 990-1001, doi:10.1097/00006123-199911000-00007.
  83. Cserr, H.F. Physiology of the choroid plexus. *Physiol Rev* **1971**, *51*, 273-311, doi:10.1152/physrev.1971.51.2.273.
  84. Redzic, Z.B.; Segal, M.B. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv Drug Deliv Rev* **2004**, *56*, 1695-1716, doi:10.1016/j.addr.2004.07.005.
  85. Dandy, W.E. Experimental Hydrocephalus. *Ann Surg* **1919**, *70*, 129-142, doi:10.1097/00000658-191908000-00001.
  86. Welch, K. Secretion of Cerebrospinal Fluid by Choroid Plexus of the Rabbit. *Am J Physiol* **1963**, *205*, 617-624, doi:10.1152/ajplegacy.1963.205.3.617.
  87. Cutler, R.W.; Page, L.; Galicich, J.; Watters, G.V. Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man. *Brain* **1968**, *91*, 707-720, doi:10.1093/brain/91.4.707.
  88. Oreskovic, D.; Klarica, M. The formation of cerebrospinal fluid: nearly a hundred years of interpretations and misinterpretations. *Brain Res Rev* **2010**, *64*, 241-262, doi:10.1016/j.brainresrev.2010.04.006.
  89. Ames, A., 3rd; Higashi, K.; Nesbett, F.B. Relation of potassium concentration in choroidplexus fluid to that in plasma. *J Physiol* **1965**, *181*, 506-515, doi:10.1113/jphysiol.1965.sp007779.
  90. Gherzi-Egea, J.F.; Strazielle, N.; Catala, M.; Silva-Vargas, V.; Doetsch, F.; Engelhardt, B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-



- cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* **2018**, *135*, 337-361, doi:10.1007/s00401-018-1807-1.
91. Mobasheri, A.; Marples, D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, *286*, C529-537, doi:10.1152/ajpcell.00408.2003.
92. Johanson, C.E.; Duncan, J.A., 3rd; Klinge, P.M.; Brinker, T.; Stopa, E.G.; Silverberg, G.D. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* **2008**, *5*, 10, doi:10.1186/1743-8454-5-10.
93. Oshio, K.; Watanabe, H.; Song, Y.; Verkman, A.S.; Manley, G.T. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J* **2005**, *19*, 76-78, doi:10.1096/fj.04-1711fje.
94. Khasawneh, A.H.; Garling, R.J.; Harris, C.A. Cerebrospinal fluid circulation: What do we know and how do we know it? *Brain Circ* **2018**, *4*, 14-18, doi:10.4103/bc.bc\_3\_18.
95. LH., W. Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. IV : The dual Source of Cerebro-Spinal Fluid. *J Med Res.* **1914**, *31*, 93-118.
96. Bering, E.A., Jr. Choroid plexus and arterial pulsation of cerebrospinal fluid; demonstration of the choroid plexuses as a cerebrospinal fluid pump. *AMA Arch Neurol Psychiatry* **1955**, *73*, 165-172, doi:10.1001/archneurpsyc.1955.02330080043012.
97. Dichiro, G. Movement of the Cerebrospinal Fluid in Human Beings. *Nature* **1964**, *204*, 290-291, doi:10.1038/204290a0.
98. Rasmussen, M.K.; Mestre, H.; Nedergaard, M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *The Lancet Neurology* **2018**, *17*, 1016-1024, doi:10.1016/s1474-4422(18)30318-1.
99. H., D.; K., W.; M.B., S. The physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid. New York. Livingstone, 1987 1013 pp. illustrated. *Annals of Neurology* **1988**, *24*, 106-106, doi:10.1002/ana.410240131.
100. LH., W. Studies on Cerebro-Spinal Fluid. No. II : The Theories of Drainage of Cerebro-Spinal Fluid with an Analysis of the Methods of Investigation. *J Med Res.* **1914**, *31*, 21-49.
101. Key, A.; Retzius, G. Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. *Stockholm : Samson & Wallin* **1875**, *2*.
102. Hassin, G.B. Changes in the Brain in Plexectomized Dogs. *Archives of Neurology & Psychiatry* **1937**, *38*, 1224, doi:10.1001/archneurpsyc.1937.02260240104008.
103. Milhorat, T.H. Choroid plexus and cerebrospinal fluid production. *Science* **1969**, *166*, 1514-1516, doi:10.1126/science.166.3912.1514.
104. TH., M. Failure of choroid plexectomy as treatment for hydrocephalus. *Surg Gynecol Obstet.* **1974**, *139*, 505-508.
105. Hammock, M.K., Milhorat, T.H. Recent studies on the formation of cerebrospinal fluid. *Dev. Med. Child Neurol. Suppl* **1973**, *15*, 27-34.
106. McComb, J.G. Recent research into the nature of cerebrospinal fluid formation and absorption. *J Neurosurg* **1983**, *59*, 369-383, doi:10.3171/jns.1983.59.3.0369.
107. Klarica, M.; Mise, B.; Vladic, A.; Rados, M.; Oreskovic, D. "Compensated hyperosmolarity" of cerebrospinal fluid and the development of hydrocephalus. *Neuroscience* **2013**, *248*, 278-289, doi:10.1016/j.neuroscience.2013.06.022.

108. Brinker, T.; Stopa, E.; Morrison, J.; Klinge, P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids Barriers CNS* **2014**, *11*, 10, doi:10.1186/2045-8118-11-10.
109. Rennels, M.L.; Gregory, T.F.; Blaumanis, O.R.; Fujimoto, K.; Grady, P.A. Evidence for a 'Paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Research* **1985**, *326*, 47-63, doi:10.1016/0006-8993(85)91383-6.
110. Abbott, N.J. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* **2004**, *45*, 545-552, doi:10.1016/j.neuint.2003.11.006.
111. Igarashi, H.; Tsujita, M.; Kwee, I.L.; Nakada, T. Water influx into cerebrospinal fluid is primarily controlled by aquaporin-4, not by aquaporin-1: 17O JJVCPE MRI study in knockout mice. *Neuroreport* **2014**, *25*, 39-43, doi:10.1097/WNR.000000000000042.
112. Badaut, J.; Ashwal, S.; Adami, A.; Tone, B.; Recker, R.; Spagnoli, D.; Ternon, B.; Obenaus, A. Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference. *J Cereb Blood Flow Metab* **2011**, *31*, 819-831, doi:10.1038/jcbfm.2010.163.
113. Ransohoff, R.M.; Engelhardt, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* **2012**, *12*, 623-635, doi:10.1038/nri3265.
114. Nakada, T.; Kwee, I.L.; Igarashi, H.; Suzuki, Y. Aquaporin-4 Functionality and Virchow-Robin Space Water Dynamics: Physiological Model for Neurovascular Coupling and Glymphatic Flow. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18081798.
115. Cserr, H.F.; Cooper, D.N.; Suri, P.K.; Patlak, C.S. Efflux of radiolabeled polyethylene glycols and albumin from rat brain. *Am J Physiol* **1981**, *240*, F319-328, doi:10.1152/ajprenal.1981.240.4.F319.
116. Cserr, H.F.; Ostrach, L.H. Bulk flow of interstitial fluid after intracranial injection of Blue Dextran 2000. *Experimental Neurology* **1974**, *45*, 50-60, doi:10.1016/0014-4886(74)90099-5.
117. Cserr, H.F. Role of secretion and bulk flow of brain interstitial fluid in brain volume regulation. *Ann NY Acad Sci* **1988**, *529*, 9-20, doi:10.1111/j.1749-6632.1988.tb51415.x.
118. Abbott, N.J.; Pizzo, M.E.; Preston, J.E.; Janigro, D.; Thorne, R.G. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol* **2018**, *135*, 387-407, doi:10.1007/s00401-018-1812-4.
119. Nilsson, C.; Stahlberg, F.; Thomsen, C.; Henriksen, O.; Herning, M.; Owman, C. Circadian variation in human cerebrospinal fluid production measured by magnetic resonance imaging. *Am J Physiol* **1992**, *262*, R20-24, doi:10.1152/ajpregu.1992.262.1.R20.
120. Yoshida, K.; Takahashi, H.; Saijo, M.; Ueguchi, T.; Tanaka, H.; Fujita, N.; Murase, K. Phase-contrast MR studies of CSF flow rate in the cerebral aqueduct and cervical subarachnoid space with correlation-based segmentation. *Magn Reson Med Sci* **2009**, *8*, 91-100, doi:10.2463/mrms.8.91.
121. Dreha-Kulaczewski, S.; Joseph, A.A.; Merboldt, K.D.; Ludwig, H.C.; Gartner, J.; Frahm, J. Inspiration is the major regulator of human CSF flow. *J Neurosci* **2015**, *35*, 2485-2491, doi:10.1523/JNEUROSCI.3246-14.2015.
122. Boulton, M.; Flessner, M.; Armstrong, D.; Hay, J.; Johnston, M. Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption into extracranial lymphatics in sheep. *Am J Physiol* **1998**, *274*, R88-96, doi:10.1152/ajpregu.1998.274.1.R88.

123. Zakharov, A.; Papaiconomou, C.; Koh, L.; Djenic, J.; Bozanovic-Sosic, R.; Johnston, M. Integrating the roles of extracranial lymphatics and intracranial veins in cerebrospinal fluid absorption in sheep. *Microvasc Res* **2004**, *67*, 96-104, doi:10.1016/j.mvr.2003.08.004.
124. Da Mesquita, S.; Fu, Z.; Kipnis, J. The Meningeal Lymphatic System: A New Player in Neurophysiology. *Neuron* **2018**, *100*, 375-388, doi:10.1016/j.neuron.2018.09.022.
125. Dunn, L.T. Raised intracranial pressure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2002**, *73 Suppl 1*, i23-27, doi:10.1136/jnnp.73.suppl\_1.i23.
126. Nestic, O.; Lee, J.; Unabia, G.C.; Johnson, K.; Ye, Z.; Vergara, L.; Hulsebosch, C.E.; Perez-Polo, J.R. Aquaporin 1 - a novel player in spinal cord injury. *J Neurochem* **2008**, *105*, 628-640, doi:10.1111/j.1471-4159.2007.05177.x.
127. Badaut, J.; Brunet, J.F.; Grollmund, L.; Hamou, M.F.; Magistretti, P.J.; Villemure, J.G.; Regli, L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir Suppl* **2003**, *86*, 495-498, doi:10.1007/978-3-7091-0651-8\_101.
128. Ribeiro Mde, C.; Hirt, L.; Bogousslavsky, J.; Regli, L.; Badaut, J. Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* **2006**, *83*, 1231-1240, doi:10.1002/jnr.20819.
129. Hirt, L.; Ternon, B.; Price, M.; Mastour, N.; Brunet, J.F.; Badaut, J. Protective role of early aquaporin 4 induction against postischemic edema formation. *J Cereb Blood Flow Metab* **2009**, *29*, 423-433, doi:10.1038/jcbfm.2008.133.
130. Hirt, L.; Fukuda, A.M.; Ambadipudi, K.; Rashid, F.; Binder, D.; Verkman, A.; Ashwal, S.; Obenaus, A.; Badaut, J. Improved long-term outcome after transient cerebral ischemia in aquaporin-4 knockout mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **2017**, *37*, 277-290, doi:10.1177/0271678X15623290.
131. Clement, T.; Rodriguez-Grande, B.; Badaut, J. Aquaporins in brain edema. *J Neurosci Res* **2020**, *98*, 9-18, doi:10.1002/jnr.24354.
132. Isaacs, A.M.; Riva-Cambrin, J.; Yavin, D.; Hockley, A.; Pringsheim, T.M.; Jette, N.; Lethebe, B.C.; Lowerison, M.; Dronyk, J.; Hamilton, M.G. Age-specific global epidemiology of hydrocephalus: Systematic review, metanalysis and global birth surveillance. *PLoS One* **2018**, *13*, e0204926, doi:10.1371/journal.pone.0204926.
133. Dewan, M.C.; Rattani, A.; Mekary, R.; Glancz, L.J.; Yunusa, I.; Baticulon, R.E.; Fieggen, G.; Wellons, J.C.; Park, K.B.; Warf, B.C. Global hydrocephalus epidemiology and incidence: systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg* **2018**, *10*.3171/2017.10.JNS17439, 1-15, doi:10.3171/2017.10.JNS17439.
134. Mao, X.; Enno, T.L.; Del Bigio, M.R. Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *Eur J Neurosci* **2006**, *23*, 2929-2936, doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04829.x.
135. Tourdias, T.; Dragonu, I.; Fushimi, Y.; Deloire, M.S.; Boiziau, C.; Brochet, B.; Moonen, C.; Petry, K.G.; Dousset, V. Aquaporin 4 correlates with apparent diffusion coefficient and hydrocephalus severity in the rat brain: a combined MRI-histological study. *Neuroimage* **2009**, *47*, 659-666, doi:10.1016/j.neuroimage.2009.04.070.
136. Bloch, O.; Manley, G.T. The role of aquaporin-4 in cerebral water transport and edema. *Neurosurg Focus* **2007**, *22*, E3, doi:10.3171/foc.2007.22.5.4.
137. Oowler, B.K.; Pitham, T.; Wang, D. Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res* **2010**, *7*, 15, doi:10.1186/1743-8454-7-15.
138. Wang, D.; Nykanen, M.; Yang, N.; Winlaw, D.; North, K.; Verkman, A.S.; Oowler, B.K. Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus

- in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency. *Mol Cell Neurosci* **2011**, *46*, 318-324, doi:10.1016/j.mcn.2010.10.003.
139. Feng, X.; Papadopoulos, M.C.; Liu, J.; Li, L.; Zhang, D.; Zhang, H.; Verkman, A.S.; Ma, T. Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *J Neurosci Res* **2009**, *87*, 1150-1155, doi:10.1002/jnr.21927.
140. Roales-Bujan, R.; Paez, P.; Guerra, M.; Rodriguez, S.; Vio, K.; Ho-Plagaro, A.; Garcia-Bonilla, M.; Rodriguez-Perez, L.M.; Dominguez-Pinos, M.D.; Rodriguez, E.M., et al. Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* **2012**, *124*, 531-546, doi:10.1007/s00401-012-0992-6.
141. Paul, L.; Madan, M.; Rammling, M.; Chigurupati, S.; Chan, S.L.; Pattisapu, J.V. Expression of aquaporin 1 and 4 in a congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* **2011**, *68*, 462-473, doi:10.1227/NEU.ob013e3182011860.
142. Iliff, J.J.; Wang, M.; Liao, Y.; Plogg, B.A.; Peng, W.; Gundersen, G.A.; Benveniste, H.; Vates, G.E.; Deane, R.; Goldman, S.A., et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* **2012**, *4*, 147ra111, doi:10.1126/scitranslmed.3003748.
143. Peng, W.; Achariyar, T.M.; Li, B.; Liao, Y.; Mestre, H.; Hitomi, E.; Regan, S.; Kasper, T.; Peng, S.; Ding, F., et al. Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **2016**, *93*, 215-225, doi:10.1016/j.nbd.2016.05.015.
144. Zeppenfeld, D.M.; Simon, M.; Haswell, J.D.; D'Abreo, D.; Murchison, C.; Quinn, J.F.; Grafe, M.R.; Woltjer, R.L.; Kaye, J.; Iliff, J.J. Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol* **2017**, *74*, 91-99, doi:10.1001/jamaneurol.2016.4370.
145. Binder, D.K.; Nagelhus, E.A.; Ottersen, O.P. Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia* **2012**, *60*, 1203-1214, doi:10.1002/glia.22317.
146. Nielsen, S.; Smith, B.L.; Christensen, E.I.; Agre, P. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 7275-7279, doi:10.1073/pnas.90.15.7275.
147. Ringstad, G.; Vatnehol, S.A.S.; Eide, P.K. Glymphatic MRI in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Brain* **2017**, *140*, 2691-2705, doi:10.1093/brain/awx191.
148. Suzuki, Y.; Nakamura, Y.; Yamada, K.; Igarashi, H.; Kasuga, K.; Yokoyama, Y.; Ikeuchi, T.; Nishizawa, M.; Kwee, I.L.; Nakada, T. Reduced CSF Water Influx in Alzheimer's Disease Supporting the beta-Amyloid Clearance Hypothesis. *PLoS One* **2015**, *10*, e0123708, doi:10.1371/journal.pone.0123708.
149. Suzuki, Y.; Nakamura, Y.; Yamada, K.; Huber, V.J.; Tsujita, M.; Nakada, T. Aquaporin-4 positron emission tomography imaging of the human brain: first report. *J Neuroimaging* **2013**, *23*, 219-223, doi:10.1111/j.1552-6569.2012.00704.x.
150. Ding, J.Y.; Kreipke, C.W.; Speirs, S.L.; Schafer, P.; Schafer, S.; Rafols, J.A. Hypoxia-inducible factor-1alpha signaling in aquaporin upregulation after traumatic brain injury. *Neurosci Lett* **2009**, *453*, 68-72, doi:10.1016/j.neulet.2009.01.077.
151. Yamamoto, N.; Yoneda, K.; Asai, K.; Sobue, K.; Tada, T.; Fujita, Y.; Katsuya, H.; Fujita, M.; Aihara, N.; Mase, M., et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Molecular Brain Research* **2001**, *90*, 26-38, doi:10.1016/s0169-328x(01)00064-x.



152. Tait, M.J.; Saadoun, S.; Bell, B.A.; Papadopoulos, M.C. Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* **2008**, *31*, 37-43, doi:10.1016/j.tins.2007.11.003.
153. MacAulay, N.; Zeuthen, T. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. *Neuroscience* **2010**, *168*, 941-956, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.016.
154. Zelenina, M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int* **2010**, *57*, 468-488, doi:10.1016/j.neuint.2010.03.022.
155. Badaut, J.; Lasbennes, F.; Magistretti, P.J.; Regli, L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**, *22*, 367-378, doi:10.1097/00004647-200204000-00001.
156. Hladky, S.B.; Barrand, M.A. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids Barriers CNS* **2014**, *11*, 26, doi:10.1186/2045-8118-11-26.
157. Oreskovic, D.; Rados, M.; Klarica, M. Role of choroid plexus in cerebrospinal fluid hydrodynamics. *Neuroscience* **2017**, *354*, 69-87, doi:10.1016/j.neuroscience.2017.04.025.
158. Ahn, J.H.; Cho, H.; Kim, J.H.; Kim, S.H.; Ham, J.S.; Park, I.; Suh, S.H.; Hong, S.P.; Song, J.H.; Hong, Y.K., et al. Meningeal lymphatic vessels at the skull base drain cerebrospinal fluid. *Nature* **2019**, *572*, 62-66, doi:10.1038/s41586-019-1419-5.
159. Hsu, M.; Rayasam, A.; Kijak, J.A.; Choi, Y.H.; Harding, J.S.; Marcus, S.A.; Karpus, W.J.; Sandor, M.; Fabry, Z. Neuroinflammation-induced lymphangiogenesis near the cribriform plate contributes to drainage of CNS-derived antigens and immune cells. *Nat Commun* **2019**, *10*, 229, doi:10.1038/s41467-018-08163-0.
160. Eide, P.K.; Valnes, L.M.; Pripp, A.H.; Mardal, K.A.; Ringstad, G. Delayed clearance of cerebrospinal fluid tracer from choroid plexus in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *J Cereb Blood Flow Metab* **2019**, 10.1177/0271678X19874790, 271678X19874790, doi:10.1177/0271678X19874790.
161. Gregoriades, J.M.C.; Madaris, A.; Alvarez, F.J.; Alvarez-Leefmans, F.J. Genetic and pharmacological inactivation of apical Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter 1 in choroid plexus epithelial cells reveals the physiological function of the cotransporter. *Am J Physiol Cell Physiol* **2019**, *316*, C525-C544, doi:10.1152/ajpcell.00026.2018.
162. Castaneyra-Ruiz, L.; Hernandez-Abad, L.G.; Carmona-Calero, E.M.; Castaneyra-Perdomo, A.; Gonzalez-Marrero, I. AQP1 Overexpression in the CSF of Obstructive Hydrocephalus and Inversion of Its Polarity in the Choroid Plexus of a Chiari Malformation Type II Case. *J Neuropathol Exp Neurol* **2019**, *78*, 641-647, doi:10.1093/jnen/nlz033.
163. Iliff, J.J.; Lee, H.; Yu, M.; Feng, T.; Logan, J.; Nedergaard, M.; Benveniste, H. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 1299-1309, doi:10.1172/JCI67677.
164. Benveniste, H.; Lee, H.; Volkow, N.D. The Glymphatic Pathway: Waste Removal from the CNS via Cerebrospinal Fluid Transport. *Neuroscientist* **2017**, *23*, 454-465, doi:10.1177/1073858417691030.
165. Oreskovic, D.; Klarica, M. Development of hydrocephalus and classical hypothesis of cerebrospinal fluid hydrodynamics: facts and illusions. *Prog Neurobiol* **2011**, *94*, 238-258, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.05.005.
166. Badaut, J.; Regli, L. Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience* **2004**, *129*, 971-981, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.035.

167. Badaut, J. Aquaglyceroporin 9 in brain pathologies. *Neuroscience* **2010**, *168*, 1047-1057, doi:10.1016/j.neuroscience.2009.10.030.
168. Nagelhus, E.A.; Ottersen, O.P. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev* **2013**, *93*, 1543-1562, doi:10.1152/physrev.00011.2013.
169. Desai, B.; Hsu, Y.; Schneller, B.; Hobbs, J.G.; Mehta, A.I.; Linninger, A. Hydrocephalus: the role of cerebral aquaporin-4 channels and computational modeling considerations of cerebrospinal fluid. *Neurosurg Focus* **2016**, *41*, E8, doi:10.3171/2016.7.FOCUS16191.
170. Zhang, C.; Chen, J.; Lu, H. Expression of aquaporin-4 and pathological characteristics of brain injury in a rat model of traumatic brain injury. *Mol Med Rep* **2015**, *12*, 7351-7357, doi:10.3892/mmr.2015.4372.
171. Frydenlund, D.S.; Bhardwaj, A.; Otsuka, T.; Mylonakou, M.N.; Yasumura, T.; Davidson, K.G.; Zeynalov, E.; Skare, O.; Laake, P.; Haug, F.M., et al. Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 13532-13536, doi:10.1073/pnas.0605796103.
172. Curran-Everett, D.C.; Iwamoto, J.; Meredith, M.P.; Krasney, J.A. Intracranial pressures and O<sub>2</sub> extraction in conscious sheep during 72 h of hypoxia. *Am J Physiol* **1991**, *261*, H103-109, doi:10.1152/ajpheart.1991.261.1.H103.
173. Loscalzo, J.; Vita, J.A. Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology and complex molecular adaptations. *Circulation* **1994**, *90*, 2556-2559, doi:10.1161/01.cir.90.5.2556.
174. Menyhart, A.; Zolei-Szenasi, D.; Puskas, T.; Makra, P.; Bari, F.; Farkas, E. Age or ischemia uncouples the blood flow response, tissue acidosis, and direct current potential signature of spreading depolarization in the rat brain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2017**, *313*, H328-H337, doi:10.1152/ajpheart.00222.2017.
175. Eide, P.K. The correlation between pulsatile intracranial pressure and indices of intracranial pressure-volume reserve capacity: results from ventricular infusion testing. *J Neurosurg* **2016**, *125*, 1493-1503, doi:10.3171/2015.11.JNS151529.
176. Dubowitz, D.J.; Dyer, E.A.; Theilmann, R.J.; Buxton, R.B.; Hopkins, S.R. Early brain swelling in acute hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **2009**, *107*, 244-252, doi:10.1152/jappphysiol.90349.2008.
177. Dyer, E.A.; Hopkins, S.R.; Perthen, J.E.; Buxton, R.B.; Dubowitz, D.J. Regional cerebral blood flow during acute hypoxia in individuals susceptible to acute mountain sickness. *Respir Physiol Neurobiol* **2008**, *160*, 267-276, doi:10.1016/j.resp.2007.10.010.
178. Wilson, M.H.; Imray, C.H.; Hargens, A.R. The headache of high altitude and microgravity--similarities with clinical syndromes of cerebral venous hypertension. *High Alt Med Biol* **2011**, *12*, 379-386, doi:10.1089/ham.2011.1026.
179. Lawley, J.S.; Levine, B.D.; Williams, M.A.; Malm, J.; Eklund, A.; Polaner, D.M.; Subudhi, A.W.; Hackett, P.H.; Roach, R.C. Cerebral spinal fluid dynamics: effect of hypoxia and implications for high-altitude illness. *J Appl Physiol (1985)* **2016**, *120*, 251-262, doi:10.1152/jappphysiol.00370.2015.
180. Kress, B.T.; Iliff, J.J.; Xia, M.; Wang, M.; Wei, H.S.; Zeppenfeld, D.; Xie, L.; Kang, H.; Xu, Q.; Liew, J.A., et al. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol* **2014**, *76*, 845-861, doi:10.1002/ana.24271.
181. K. Akai, S.U., U. Tanaka, A. Komatsu. Normal pressure hydrocephalus. Neuropathological study. *Acta Pathol* **1987**, 97-110.

182. S. Destian, L.A.H., R.D. Zimmerman, S. Morgello, M.D. Deck. Differentiation between meningeal fibrosis and chronic subdural hematoma after ventricular shunting: value of enhanced CT and MR scans. *AJNR Am. J. Neuroradiol* **1989**, 1021–1026.
183. Bothwell, S.W.; Janigro, D.; Patabendige, A. Cerebrospinal fluid dynamics and intracranial pressure elevation in neurological diseases. *Fluids Barriers CNS* **2019**, 16, 9, doi:10.1186/s12987-019-0129-6.
184. Simon, M.J.; Iliff, J.J. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* **2016**, 1862, 442–451, doi:10.1016/j.bbadis.2015.10.014.
185. Huber, V.J.; Tsujita, M.; Yamazaki, M.; Sakimura, K.; Nakada, T. Identification of arylsulfonamides as Aquaporin 4 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, 17, 1270–1273, doi:10.1016/j.bmcl.2006.12.010.
186. Huber, V.J.; Tsujita, M.; Nakada, T. Identification of aquaporin 4 inhibitors using in vitro and in silico methods. *Bioorg Med Chem* **2009**, 17, 411–417, doi:10.1016/j.bmc.2007.12.040.
187. Yang, B.; Zhang, H.; Verkman, A.S. Lack of aquaporin-4 water transport inhibition by antiepileptics and arylsulfonamides. *Bioorg Med Chem* **2008**, 16, 7489–7493, doi:10.1016/j.bmc.2008.06.005.
188. Tanimura, Y.; Hiroaki, Y.; Fujiyoshi, Y. Acetazolamide reversibly inhibits water conduction by aquaporin-4. *J Struct Biol* **2009**, 166, 16–21, doi:10.1016/j.jsb.2008.11.010.
189. Gao, F.; Zheng, M.; Hua, Y.; Keep, R.F.; Xi, G. Acetazolamide Attenuates Thrombin-Induced Hydrocephalus. *Acta Neurochir Suppl* **2016**, 121, 373–377, doi:10.1007/978-3-319-18497-5\_64.
190. Gilbert, G.J.; Alperin, N.; Olio, C.; Relkin, N. Low-dose acetazolamide reverses periventricular white matter hyperintensities in iNPH. *Neurology* **2014**, 83, 1773, doi:10.1212/WNL.0000000000000994.
191. Ivkovic, M.; Reiss-Zimmermann, M.; Katzen, H.; Preuss, M.; Kovanlikaya, I.; Heier, L.; Alperin, N.; Hoffmann, K.T.; Relkin, N. MRI assessment of the effects of acetazolamide and external lumbar drainage in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Fluids Barriers CNS* **2015**, 12, 9, doi:10.1186/s12987-015-0004-z.
192. Igarashi, H.; Huber, V.J.; Tsujita, M.; Nakada, T. Pretreatment with a novel aquaporin 4 inhibitor, TGN-020, significantly reduces ischemic cerebral edema. *Neurol Sci* **2011**, 32, 113–116, doi:10.1007/s10072-010-0431-1.
193. Pirici, I.; Balsanu, T.A.; Bogdan, C.; Margaritescu, C.; Divan, T.; Vitalie, V.; Mogoanta, L.; Pirici, D.; Carare, R.O.; Muresanu, D.F. Inhibition of Aquaporin-4 Improves the Outcome of Ischaemic Stroke and Modulates Brain Paravascular Drainage Pathways. *Int J Mol Sci* **2017**, 19, doi:10.3390/ijms19010046.
194. Vandebroek, A.; Yasui, M. Regulation of AQP4 in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* **2020**, 21, doi:10.3390/ijms21051603.
195. Relkin, N.; Marmarou, A.; Klinge, P.; Bergsneider, M.; Black, P.M. Diagnosing idiopathic normal-pressure hydrocephalus. *Neurosurgery* **2005**, 57, S4–16; discussion ii–v, doi:10.1227/01.neu.0000168185.29659.c5.
196. Hashimoto, M.; Ishikawa, M.; Mori, E.; Kuwana, N.; Study of, I.o.n.i. Diagnosis of idiopathic normal pressure hydrocephalus is supported by MRI-based scheme: a prospective cohort study. *Cerebrospinal Fluid Res* **2010**, 7, 18, doi:10.1186/1743-8454-7-18.
197. N., L. The Saga of the Monro-Kellie Doctrine. *Springer, Berlin* **1983**, 10.1007/978-3-642-69204-8\_6, doi:10.1007/978-3-642-69204-8\_6.

198. Eide, P.K.; Hansson, H.A. Astrogliosis and impaired aquaporin-4 and dystrophin systems in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Neuropathol Appl Neurobiol* **2018**, *44*, 474-490, doi:10.1111/nan.12420.
199. Vajda, Z.; Pedersen, M.; Fuchtbauer, E.M.; Wertz, K.; Stodkilde-Jorgensen, H.; Sulyok, E.; Doczi, T.; Neely, J.D.; Agre, P.; Frokiaer, J., et al. Delayed onset of brain edema and mislocalization of aquaporin-4 in dystrophin-null transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99*, 13131-13136, doi:10.1073/pnas.192457099.
200. Nagelhus, E.A.; Mathiisen, T.M.; Ottersen, O.P. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* **2004**, *129*, 905-913, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.08.053.
201. Hannocks, M.J.; Pizzo, M.E.; Huppert, J.; Deshpande, T.; Abbott, N.J.; Thorne, R.G.; Sorokin, L. Molecular characterization of perivascular drainage pathways in the murine brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **2018**, *38*, 669-686, doi:10.1177/0271678X17749689.
202. Jaraj, D.; Agerskov, S.; Rabiei, K.; Marlow, T.; Jensen, C.; Guo, X.; Kern, S.; Wikkelsø, C.; Skoog, I. Vascular factors in suspected normal pressure hydrocephalus: A population-based study. *Neurology* **2016**, *86*, 592-599, doi:10.1212/WNL.0000000000002369.
203. Israelsson, H.; Carlberg, B.; Wikkelsø, C.; Laurell, K.; Kahlon, B.; Leijon, G.; Eklund, A.; Malm, J. Vascular risk factors in INPH: A prospective case-control study (the INPH-CRasH study). *Neurology* **2017**, *88*, 577-585, doi:10.1212/WNL.0000000000003583.
204. Roman, G.C.; Verma, A.K.; Zhang, Y.J.; Fung, S.H. Idiopathic normal-pressure hydrocephalus and obstructive sleep apnea are frequently associated: A prospective cohort study. *J Neurol Sci* **2018**, *395*, 164-168, doi:10.1016/j.jns.2018.10.005.
205. Malm, J.; Graff-Radford, N.R.; Ishikawa, M.; Kristensen, B.; Leinonen, V.; Mori, E.; Owler, B.K.; Tullberg, M.; Williams, M.A.; Relkin, N.R. Influence of comorbidities in idiopathic normal pressure hydrocephalus - research and clinical care. A report of the ISHCSF task force on comorbidities in INPH. *Fluids Barriers CNS* **2013**, *10*, 22, doi:10.1186/2045-8118-10-22.





